

- 1 -

明細書

脳移行活性を有するポリペプチド、およびその利用

5 技術分野

本発明は、脳移行活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドを含む分子、並びに脳移行活性を付与する薬剤に関する。

背景技術

- 10 脳は血液脳関門が存在するため、薬物などを経口摂取しても注射などにより投与しても、ほかの臓器に比べて有効濃度が得られにくい特徴がある。一方、大量投与することにより有効な濃度を脳内で確保することが可能にはなるが、末梢血液中には大過剰の薬物を注入することになり、腎障害や肝障害などの副作用の問題が生じる。そこで、脳への選択的薬物輸送のシステムを開発することが必要と
- 15 なり、実際に多くの研究がなされてきている。このような研究開発の多くは、脂溶性が高い物質ほど血液脳関門を通過しやすいという脳の血管内皮細胞の性質を利用した、薬物そのものの化学修飾による脳移行性の増大をはかるものであった。このような方法論では薬物の脳移行性が最大数倍程度改善するものの、全体としてはほとんど誤差範囲に留まるにすぎないという結果である。これは、末梢臓器
- 20 への物質の浸透が血管内皮細胞の細胞間隙を通過するのに対して、脳の血管内皮細胞は細胞間隙が密着帯という特殊な構造を形成し細胞間隙からの血液成分の浸透がほとんどみられないため、脳への物質輸送は脂溶性の化学修飾を行い直接細胞膜にとけ込ませて浸透させるということを行わなければならない。つまり、脳への物質輸送は末梢臓器と違って迂回路がないため、正面突破により細胞の中を
- 25 浸透させるということを行う方法論である。しかしそのメカニズムが異なるため、効率が数千から数万倍低く、したがって、脳特異的な薬物輸送とはいえない。

- 2 -

ところが、最近の技術的な進歩により、脳血管内皮細胞に発現している膜表面タンパク質を標的化する方法論が開発されてきた。特に脳内に薬物を取り込ませるにはトランスポーター（上述のように脳は細胞間隙からの物質の浸透がないため、血液中のアミノ酸や糖分は血液脳関門上に発現するトランスポーターに結合して脳内に特異的に運搬される。トランスフェリン受容体は脳の活動に必要な金属結合型酵素に金属イオンを供給するトランスフェリンというタンパク質を脳に輸送するトランスポーター分子である。）と呼ばれるタンパク質の機能を利用することが有効であり、現在、トランスフェリン受容体を特殊な抗体で標的化することにより脳への薬物の移行性を数十倍から100倍程度増大させることができると報告された（非特許文献1参照）。

しかし、トランスフェリン受容体は脳血管内皮細胞だけに発現しているわけではなく、肝臓や腎臓にも脳血管内皮細胞より多量に発現しているため、このシステムを利用した場合、脳への輸送量の増大とともに肝臓や腎臓にも薬物導入が起こる。従って、脳特異的物質輸送とは言い難い。このほか、いくつかのトランスポーター分子やP-糖タンパク質のようなアンチポーター分子を利用するものなど報告されているが、いずれも有効性が確認できていない。

これとは別に、特殊機能性ペプチドを利用する方法が最近開発された。これはPTD配列とよばれるもので、HIV tat 遺伝子産物が細胞の核に移行する場合に必要なペプチド配列として同定されていた。このペプチドは核膜を通過するだけでなくあらゆる種類の細胞膜も通過する機能があるため（非特許文献2参照）、血液中に注入すると全身の臓器に分布することができる。脳血管内皮細胞も細胞膜を通してPTDペプチドが通過するため、脳への物質輸送をはかることができる。しかし、末梢臓器の場合、PTD配列による細胞膜経由の移入と細胞間隙からの浸透の両者が有効であるのに対し、脳は後者の浸透がみられないため、脳の物質の浸透率はほかの臓器に比べて遙かに低い。この技術でも脳特異性が示すことができない。

- 3 -

一方、最近になって、血管内皮細胞の臓器ごとの特殊性を規定している分子について報告がされるようになった。生体の各臓器はそれぞれ役割や特殊性によって栄養要求性や血液から供給される様々な因子の必要度が異なるため、それぞれの臓器に分布する血管内皮細胞はその存在場所によって少しずつ違った特徴を持っていることが徐々に明らかになってきている。さらに、血管内皮細胞は血液中に存在する炎症細胞や免疫細胞との直接の接点になっており、炎症や病態時にそれらの細胞が浸潤することをコントロールしている。このときに、侵入する細胞は炎症時に現れる炎症性のホーミングレセプターを認識して病巣に集積することが知られていたが、それだけではなく、組織特異的な血管内皮細胞マーカー分子 (cellular zip code とよばれている) も認識していることが明らかになってきた。この細胞マーカー分子の役割はまだよくわかっていないが、すくなくともこの分子を標的化すれば臓器の血管内皮細胞までは標的化できると考えられ、注目されている (非特許文献 3 参照)。ただ、この方法では各臓器の血管内皮細胞までは標的化できるが、どうやって臓器の実質に目的分子を導入するかを工夫しなければならぬ。

(非特許文献 1) Ningya Shi and William M. Pardridge, Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 97, Issue 13, 7567-7572, June 20, 2000

(非特許文献 2) Steven R. Schwarze, Alan Ho, Adamina Vocero-Akbani, and Steven F. Dowdy, In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science* 1999 September 3; 285: 1569-1572.

(非特許文献 3) Renata Pasqualini, Erkki Ruoslahti, Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* Vol. 380, 28, March 1996.

- 4 -

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、脳移行活性に関与する因子（モチーフ配列）を見出すことにある。さらに、本発明は、脳移行活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドを含む分子、並びに脳移行活性を付与する薬剤の提供を目的とする。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行った。細胞が組織に侵入するメカニズムには細胞間隙を通過する経路（paracellular pathway）と細胞の中を通過する経路（trans cellular pathway）があることが知られている。後者の経路は特殊な状況で起こると仮定されていた。本発明者らは、ある特殊な細胞（ミクログリア）が血液脳関門を破壊せずに脳内に侵入する現象を研究している内にその細胞には trans cellular pathway を誘導する分子が存在することを見いだした（Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H., Hayakawa, M., Kanno, T., Nagatsu, T. FEBS Lett, 433: 37-40, 1998. Brain-specific gene expression by immortalized microglial cell-mediated gene transfer in the mammalian brain.）。

本発明者らは、この分子の活性部位のペプチド断片を利用するとこれまで不可能であった脳特異的標的化と物質輸送が可能となるものと想到した。

本発明者らは、ミクログリアには、上記メカニズムを誘起するリガンド分子が存在しているものと考えられることから、その分子を分離同定するために、ミクログリアから mRNA を分離し、cDNA ライブラリーを作製して T7 ファージに組み込み、脳移行活性を発現するようになったファージをスクリーニングすることで目的分子の同定に成功した。

さらに本発明者らは、ランダムなアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする DNA を合成してファージライブラリーに組み込んだものを作製して、脳移行活性を有するポリペプチドのスクリーニングを行った。

その結果、脳移行活性を有する複数のポリペプチドを取得し、これらのポリペ

プチド配列から、脳移行活性に関与すると考えられるアミノ酸モチーフ配列、および配列の特徴を見出すことに成功した。

さらに本発明者らは、上記モチーフ配列を有する合成ポリペプチドを被検動物へ投与することにより、当該ポリペプチドが実際に脳への移行活性を有することを確認した。また、本発明のポリペプチドの脳移行のメカニズムを解明すべく鋭意研究を行い、該ポリペプチドがトランスマイグレーション (trans cellular pathway) 機構によって、脳組織へ移行することを明らかにした。即ち、本発明のペプチドは、トランスマイグレーション誘導能を付与する分子としても非常に有用である。

10 本発明のアミノ酸モチーフ配列あるいはアミノ酸の特徴を有するポリペプチドは、脳移行活性を有するものと考えられる。また、該ポリペプチドを付加した分子は、例えば、ファージ粒子のような大きな分子であっても、脳移行活性を示すことが本発明者らによって明らかとなった。本発明者らによって見出されたモチーフ配列を含むポリペプチドは、任意の分子と結合させることにより、該分子に
15 脳移行活性を付与することが可能であり、従って、該モチーフ配列を含むポリペプチドは、脳移行活性を付与する薬剤となるものと考えられる。

上記の如く本発明者らは、上記課題の解決に成功し、本発明を完成させた。即ち、本発明は、脳移行活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドを含む分子、並びに脳移行活性を付与する薬剤に関し、より具体的には、

- 20 [1] 塩基性アミノ酸残基 (KまたはR) を10%以上含有する、脳移行活性を有するポリペプチド (脳移行性ポリペプチド)、
- [2] 環状ペプチド領域を有するポリペプチドであって、該環状ペプチド領域において塩基性アミノ酸残基 (KまたはR) が10%以上含まれる、脳移行活性を有するポリペプチド、
- 25 [3] 環状ペプチド領域を有するポリペプチドであって、該環状ペプチド領域に少なくとも1以上の塩基性アミノ酸残基 (KまたはR) を有する、脳移

- 6 -

行活性を有するポリペプチド、

- 〔4〕 環状ペプチド領域を有するポリペプチドであって、該環状ペプチド領域に少なくとも1以上の塩基性アミノ酸残基（KまたはR）を有し、かつ、該環状領域の残りのアミノ酸残基のうち80%以上が以下のアミノ酸残基から選択されることを特徴とする、脳移行活性を有するポリペプチド、

G、A、V、L、S、T、P、Q、H、N

- 〔5〕 以下のアミノ酸モチーフ配列を含むポリペプチドであって、脳移行活性を有するポリペプチド、

$X_1 - (R \text{ または } K) - X_3 - X_4$ 、または

$X_4 - X_3 - (R \text{ または } K) - X_1$

式中、 X_1 はS、T、N、P、VまたはL、 X_3 は任意のアミノ酸、 X_4 はG、S、T、C、N、L、Q、またはYを表す、

- 〔6〕 環状領域に〔5〕に記載のアミノ酸モチーフ配列が含まれる、〔2〕～〔4〕のいずれかに記載のポリペプチド、

- 〔7〕 アミノ酸モチーフ配列が以下の配列である、〔5〕または〔6〕に記載のポリペプチド、

$X_1 - (R \text{ または } K) - X_3 - X_4$ 、または

$X_4 - X_3 - (R \text{ または } K) - X_1$

式中、 X_1 はS、T、N、PまたはV、 X_3 は任意のアミノ酸、 X_4 は非電荷極性アミノ酸（G、S、T、C、N、Q、Y）を表す、

- 〔8〕 アミノ酸モチーフ配列が以下の配列である、〔5〕または〔6〕に記載のポリペプチド、

$X_1 - (R \text{ または } K) - X_3 - X_4$ 、または

$X_4 - X_3 - (R \text{ または } K) - X_1$

式中、 X_1 はS、T、PまたはL、 X_3 は任意のアミノ酸、 X_4 はS、T、C、L、またはQを表す、

- 7 -

- [9] トランスマイグレーション誘導活性を有する、[1] ~ [8] のいずれかに記載のポリペプチド、
- [1 0] 脳の血管内皮細胞と結合する活性を有する、[1] ~ [8] のいずれかに記載のポリペプチド、
- 5 [1 1] 以下の (a) ~ (c) のいずれかに記載のポリペプチド、
- (a) 配列番号： 1 ~ 1 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- (b) 前記 (a) のポリペプチドの両端のシステイン同士のジスルフィド結合によって環状化されたペプチド領域を含む、ポリペプチド、
- 10 (c) 配列番号： 1 ~ 1 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列において、 1 または数個のアミノ酸が付加、欠失、もしくは置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、脳移行活性を有するポリペプチド、
- [1 2] ポリペプチドの長さが 9 アミノ酸以内である、[1] ~ [1 1] のいずれかに記載のポリペプチド、
- 15 [1 3] [1] ~ [1 2] のいずれかに記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
- [1 4] [1] ~ [1 2] のいずれかに記載のポリペプチドと結合する抗体、
- [1 5] [1] ~ [1 2] のいずれかに記載のポリペプチドを含有する、任意の分子に脳移行活性を付与するための薬剤、
- 20 [1 6] 任意の分子が任意のポリペプチドである、[1 5] に記載の薬剤、
- [1 7] [1] ~ [1 2] のいずれかに記載のポリペプチドを含む、脳移行活性を有する分子、
- [1 8] 分子がファージ粒子、または該ファージ粒子の外殻タンパク質である、[1 7] に記載の分子、
- 25 [1 9] 分子が [1] ~ [1 2] のいずれかに記載のポリペプチドとの融合タンパク質である、[1 7] に記載の分子、

[20] [1] ~ [12] のいずれかに記載のポリペプチドからなる、脳送達用キャリア、

[21] [1] ~ [12] のいずれかに記載のポリペプチドが、ミセル、リポソームまたはマイクロカプセルと結合した構造からなる、脳送達用キャリア、

[22] [20] または [21] に記載の脳送達用キャリアに薬物が担持された構造からなる、脳疾患治療剤、

[23] 任意の分子に [1] ~ [12] のいずれかに記載のポリペプチドを結合させる工程を含む、脳移行活性を有する分子の製造方法、

10 [24] 以下の工程 (a) ~ (c) を含む、脳移行活性を有するタンパク質分子の製造方法、

(a) 発現可能な状態で任意のタンパク質分子をコードするDNAと、

[1] ~ [12] のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNAとが結合した構造のDNAを含む発現ベクターを作製する工程

15 (b) 前記発現ベクターを細胞へ導入する工程

(c) 前記ベクターからの発現産物を回収する工程

[25] 以下の工程 (a) および (b) を含む、任意の分子を非ヒト動物の脳へ移行させる方法、

(a) 任意の分子と [1] ~ [12] のいずれかに記載のポリペプチドとが結合した構造の脳移行活性を有する分子を製造する工程

20 (b) 前記分子を非ヒト動物体内へ投与する工程

[26] 以下の工程 (a) ~ (c) を含む、[1] ~ [12] のいずれかに記載のポリペプチドに対して結合活性を有する分子のスクリーニング方法、

(a) [1] ~ [12] のいずれかに記載のポリペプチドと被検分子とを接触させる工程

25 (b) 前記ポリペプチドと被検分子との結合活性を検出する工程

(c) 前記ポリペプチドと結合する分子を選択する工程

〔27〕 以下の工程 (a) ~ (d) を含む、脳移行活性を有するポリペプチドのスクリーニング方法、

5 (a) 被検ポリペプチドをファージ外殻タンパク質上へ提示させたファージ粒子を作製する工程

(b) 該ファージ粒子を、非ヒト動物へ投与する工程

(c) 該非ヒト動物の脳組織からファージ粒子を回収する工程

(d) 工程 (c) において回収されたファージ粒子に提示された被検ポリペプチドを脳移行活性を有するポリペプチドとして選択する工程

10 〔28〕 被検ポリペプチドが〔5〕、〔7〕または〔8〕のいずれかに記載のアミノ酸モチーフ配列を含む、〔27〕に記載のスクリーニング方法、

〔29〕 ファージがM13ファージまたはT7ファージである、〔27〕に記載のスクリーニング方法、

〔30〕 工程 (a) につづいて、さらに、脳の血管内皮細胞と結合するファージ粒子を選択する工程、を含む〔27〕に記載のスクリーニング方法、
15 を提供するものである。

本発明は、脳移行活性を有するポリペプチドを提供する。一般に血液から脳組織内への物質の移行は、血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) と呼ばれる仕組みによって制限されている。これによって脳は有害物質等から守られている。

20 本発明において「脳移行活性」とは、ポリペプチド等の分子が体内へ投与（例えば、静脈投与等）された際に、該分子が脳組織内へ移行する活性を言う。本発明のポリペプチドは、通常、脳移行活性（脳移行性）を有するポリペプチドであると表現することができるが、例えば、血液脳関門の通可能、あるいはトランスマイグレーション（トランスサイトシス）誘導能を有するポリペプチドと表現す
25 ることも可能である。また、本発明のポリペプチドは、他の物質（分子）と結合させることにより、他の分子を脳へ移行させる機能を有する。従って、本発明の

- 10 -

ポリペプチドは、「脳移行活性を付与するポリペプチド」、「脳移行ペプチドタ
グ」、「脳移行活性付与剤」と表現することもできる。

また、本発明者らは、9アミノ酸長のポリペプチドが、他の物質（分子）に対
し、有効な脳移行活性を付与できることを明らかにした。従って、少なくとも、
5 9アミノ酸程度の短いポリペプチドであっても、他の分子に対し有効な脳移行活
性を付与する機能があるものと言える。本発明のポリペプチドの長さは、特に制
限されないが、例えば100アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内
であり、さらに好ましくは9アミノ酸以内であり、最も好ましくは4～9アミノ
酸長である。

10 後述の実施例で示す実験によって、以下の配列を有するポリペプチドは、脳移
行活性を有することが判明した。

(表1)

	名称	アミノ酸配列
	T2J001	CSNLLSRHC (配列番号：1)
15	T2J002	CSLNTRSQC (配列番号：2)
	T2J003	CVAPSRATC (配列番号：3)
	T2J004	CVVRHLQQC (配列番号：4)
	T2J004V3L	CVLRHLQQC (配列番号：5)
	T2J006	CRQLVQVHC (配列番号：6)
20	T2J007	CGPLKTSAC (配列番号：7)
	T2J008	CLKPGPKHC (配列番号：8)
	T2J009	CRSPQPAVC (配列番号：9)
	T2J012	CNPLSPRSC (配列番号：10)
	T2J013	CPAGAVKSC (配列番号：11)
25	T2J013V6L	CPAGALKSC (配列番号：12)

本発明のポリペプチドの好ましい態様においては、以下の〔配列1〕に記載の

- 11 -

アミノ酸モチーフ配列、より好ましくは〔配列 2〕に記載のアミノ酸モチーフ配列、または〔配列 3〕に記載のアミノ酸モチーフ配列を含むポリペプチドである。換言すれば、本発明の好ましい態様においては、以下の〔配列 1〕～〔配列 3〕のいずれかのアミノ酸モチーフ配列を少なくとも有するポリペプチドを提供する。

5

〔配列 1〕 $X_1 - (R \text{ または } K) - X_3 - X_4$ 、または
 $X_4 - X_3 - (R \text{ または } K) - X_1$

式中、

10 X_1 は S (セリン)、T (トレオニン)、N (アスパラギン)、P (プロリン)、V (バリン) または L (ロイシン) ;

X_3 は任意のアミノ酸 ;

X_4 は G (グリシン)、S (セリン)、T (チロシン)、C (システイン)、N (アスパラギン)、L (ロイシン)、Q (グルタミン)、または Y (チロシン) ;

15 を表す。

〔配列 2〕 $X_1 - (R \text{ または } K) - X_3 - X_4$ 、または
 $X_4 - X_3 - (R \text{ または } K) - X_1$

式中、

20 X_1 は S (セリン)、T (トレオニン)、N (アスパラギン)、P (プロリン)、または V (バリン) [ただし、 X_1 は、さらに好ましくは S または T] ;

X_3 は任意のアミノ酸 ;

X_4 は G (グリシン)、S (セリン)、T (チロシン)、C (システイン)、N (アスパラギン)、Q (グルタミン)、または Y (チロシン) [ただし、

25 X_4 は、さらに好ましくは T、Q または C] ;

を表す。また、上記 (R または K) は、さらに好ましくは R である。

- 12 -

一般的に、これらアミノ酸（G、S、T、C、N、Q、Y）は、非電荷極性アミノ酸に分類される。

〔配列3〕 $X_1 - (R \text{ または } K) - X_3 - X_4$ 、または
 $X_4 - X_3 - (R \text{ または } K) - X_1$

5 式中、

X_1 はS（セリン）、T（トレオニン）、P（プロリン）、またはL（ロイシン）；

X_3 は任意のアミノ酸；

X_4 はG（グリシン）、S（セリン）、T（チロシン）、C（システイン）、
10 L（ロイシン）、またはQ（グルタミン）；
を表す。

なお、本明細書におけるアミノ酸は、一般的に使用される一文字表記にならって記載した（例えば、Rはアルギニン、Kはリシン）。また、一般的な記載方法にならない、N末からC末方向の順にアミノ酸配列を記載した。

15 本発明者は、上記ペプチドが環状化された（より具体的には、上記ペプチドにおける両端のシステイン間でジスルフィド結合（S-S 結合）が形成され環状化された）構造を有するポリペプチドは、さらに高い脳移行活性を有することを見出した。

従って本発明のポリペプチドの好ましい態様においては、環状構造を有するポリペプチドである。本発明においては、この環状領域を構成するポリペプチドについて、上記モチーフ配列を見出すことができる。該モチーフ配列を構成するアミノ酸は、互いに隣接する4アミノ酸残基から構成される。これら隣接するアミノ酸同士は、通常、ペプチド結合を形成するが、隣接するアミノ酸がシステイン残基同士である場合には、ジスルフィド結合を形成し得る。本発明のモチーフ配列における上記「隣接する4アミノ酸残基」とは、互いにペプチド結合を形成している場合に制限されず、隣接するアミノ酸がシステインである場合には、ジス

20
25

- 13 -

ルフィド結合を形成している場合であってもよい。即ち、本明細書における上記〔配列1〕～〔配列3〕の、「-」は、通常、ペプチド結合を意味するが、隣接するアミノ酸がシステインである場合には、該「-」はジスルフィド結合(S-S結合)であってもよい。例えば、直鎖上のポリペプチドのアミノ酸配列において、

5 本発明のモチーフ配列が見出されない場合であっても、環状構造を形成することにより隣接するようになったアミノ酸によって、本発明のモチーフが形成される場合がある。

また、本発明の好ましい態様においては、上記の4アミノ酸からなるモチーフ配列を含むようなポリペプチドであれば、上記のモチーフ配列以外のアミノ酸配

10 列の種類は特に制限されない。

また、(表1)に記載した脳移行活性を有するポリペプチドは、以下の特徴を有する。

環状構造を形成し得るポリペプチド領域(即ち、両端のシステインを除くアミノ酸配列)において、(1)全てのポリペプチドには塩基性アミノ酸のKまたは

15 Rが含まれ、(2)残りのアミノ酸残基は、10種のアミノ酸〔G、A、V、L、S、T、P、Q、H、N〕のいずれかから構成される。

従って、本発明の好ましい態様においては、環状領域を有するポリペプチドであって、該環状領域に少なくとも1以上の塩基性アミノ酸残基(KまたはR)を有し、かつ、該環状領域の残りのアミノ酸残基がアミノ酸残基〔G、A、V、L、

20 S、T、P、Q、H、N〕から選択される(通常、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは100%)ことを特徴とする(この特徴を、本明細書において「特徴1」と記載する場合あり)、脳移行活性ポリペプチドを提供する。本発明のさらに好ましい態様においては、上記「特徴1」を有するポリペプチドであって、本発明

25 のモチーフ配列(〔配列1〕～〔配列3〕)を含むポリペプチドである。

また、上記「特徴1」において記載したように、本発明の全てのポリペプチド

- 14 -

には、塩基性アミノ酸（KまたはR）が含まれるという特徴が見出された。例えば、実施例に使用された9アミノ酸のポリペプチドにおいては、少なくとも1つの塩基性アミノ酸が見出された（全アミノ酸に対する含有率は、 $1/9 = 0.11$ （11%）以上）。

5 従って、本発明の一つの態様として、以下のポリペプチドを提供する。

（a）塩基性アミノ酸残基（KまたはR）を10%以上含有する、脳移行活性を有するポリペプチド。

（b）環状ペプチド領域を有するポリペプチドであって、該環状ペプチド領域において塩基性アミノ酸残基（KまたはR）が10%以上含まれる、脳移行活性を
10 有するポリペプチド。

（c）環状ペプチド領域を有するポリペプチドであって、該環状ペプチド領域に少なくとも1以上の塩基性アミノ酸残基（KまたはR）を有する、脳移行活性を有するポリペプチド。

本発明のポリペプチドの長さの上限についても、特に制限されるものではない
15 が、通常、上記4アミノ酸配列のモチーフあるいは前記「特徴1」を有する7アミノ酸もしくはそれ以上の長さのポリペプチドであれば、効率的な脳移行活性を有するものと考えられる。長さの上限についても特に制限されないが、一般に50アミノ酸長以下、好ましくは35アミノ酸長以下のポリペプチドについては、十分に脳移行活性を有するものと考えられる。また、該ポリペプチドを含むさら
20 に長いポリペプチドであっても、通常、脳移行活性を有することから、本発明のポリペプチドは、その長さを制限されない。

本発明の好ましい態様において環状化されるポリペプチド領域の長さは、特に制限されない。本発明者は環状化されるペプチドの一例として、末端にシステイン残基を配する9アミノ酸残基のポリペプチドを実験に供した。即ち、例えば、
25 10アミノ酸あるいはそれ以上の長さの環状構造を有するポリペプチドであっても、本発明のモチーフ配列もしくは上述の「特徴1」を有するポリペプチドであ

- 15 -

れば、脳移行活性を有するものと考えられる。従って、本発明のポリペプチドにおける環状ペプチド領域の長さは、特に制限されないが、例えば100アミノ酸以内であり、好ましくは50アミノ酸以内であり、より好ましくは4~30アミノ酸であり、さらに好ましくは4~15アミノ酸であり、さらに好ましくは4~9アミノ酸であり、最も好ましくは4~7アミノ酸である。

また好ましい態様においては、本発明のポリペプチドは以下の(A)および/または(B)の機能(活性)を有することを特徴とする。

(A) トランスマイグレーション(トランスサイトーシス)誘導活性

(B) 脳の血管内皮細胞と結合する活性

10 上記(A)における「トランスマイグレーション」とは、ある分子が脳へ侵入する際に、血管内皮細胞の細胞間隙を通過するのではなく、血管内皮細胞内を通過する現象を言う。これは「trans-endothelial cell migration」、「trans cellular pathway」、もしくは「トランスサイトーシス」とも呼ばれ、このメカニズムによって血管内皮細胞を通過する分子(細胞等)は、その表面にシグナル分子を持ち、血管内皮細胞表面上にある受容体を介して血管内皮細胞に上記現象を誘導するものと考えられる(図1)。

本発明のポリペプチドは、血管内皮細胞に上記トランスマイグレーションを誘導する活性を有するものと考えられる。即ち、本発明のポリペプチドは、トランスマイグレーションを誘導するためのシグナル分子としての役割を担うものと考えられる。

また、上記シグナル分子は、トランスマイグレーションの初期段階において脳の血管内皮細胞と(例えば、該細胞上の受容体と)結合するものと考えられる。従って、好ましい態様においては、本発明のポリペプチドは、脳の血管内皮細胞と結合する活性を有することを特徴の一つとする。

25 任意の被検分子について、上記(A)のトランスマイグレーション誘導活性を有するか否か、あるいは、上記(B)の脳の血管内皮細胞と結合するか否かは、

- 16 -

当業者においては公知の方法を利用して適宜評価することができる。一例を示せば、蛍光標識を施した被検分子を血管内に投与し、脳の血管内皮細胞の凍結切片を蛍光顕微鏡によって観察することにより評価することができる。例えば、蛍光標識された分子が付着した血管内皮細胞が観察されれば、被検分子は上記（B）

- 5 の活性を有するものと判定され、また、蛍光標識された被検分子が血管内皮細胞内において観察されれば、被検分子は上記（A）の活性を有するものと判定される。

- また、上記蛍光標識方法以外にも、アイソトープ標識、PET リガンドによる標識、マグネタイトなどと結合させて MRI で検出する方法等が挙げられる。上記 *in vivo* 法以外のその他の態様としては、例えば、血管内皮細胞の培養系に BBB
- 10 を誘導して、上記被検分子を投与することによっても、トランスマイグレーション誘導活性を評価することができる。透過が確認できれば、上記（A）の活性を有するものと判定され、また、洗浄後に血管内皮細胞に接着していれば、上記（B）の活性を有するものと判定される。

- 15 また本発明における「脳の血管内皮細胞」とは、例えば、マウス MBEC4、市販のヒト由来脳血管内皮細胞 BBEC、牛脳由来の一時培養血管内皮細胞等の細胞、また末梢血管由来血管内皮細胞とアストロサイトを共培養し BBB 様機能を誘導したもの等を示すことができる。

- 当業者においては任意のポリペプチド（合成ペプチド）、あるいは、該ペプチドを有する分子について、これらの細胞を利用して、上記（A）または（B）の
- 20 活性の評価を行うことが可能である。具体的には、後述の実施例に記載の方法により、適宜、活性を評価することができる。

- 本発明のポリペプチドとしては、より具体的には、例えば、上述の表 1 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドを挙げることができるが、これらは本発明の
- 25 ポリペプチドの一例であり、本発明のポリペプチドはこれらに限定されない。表 1 のアミノ酸配列からなるポリペプチド、もしくは該ポリペプチドを外殻タンパ

ク質上に発現させたファージ分子は、後述の実施例で示すように、実際に脳移行活性を有することが本発明者によって示された。

従って本発明は、以下の（a）～（c）のいずれかに記載のポリペプチドを提供する。

5 （a）配列番号：1～12のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

（b）前記（a）のポリペプチドの両端のシステイン同士のジスルフィド結合によって環状化されたペプチド領域を含む、ポリペプチド

（c）配列番号：1～12のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1または
10 数個のアミノ酸が付加、欠失、もしくは置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、脳移行活性を有するポリペプチド

上記（c）においては、本発明のモチーフ配列（〔配列1〕～〔配列3〕）以外のアミノ酸残基において付加、欠失、もしくは置換されることが好ましい。および／または、本発明の上記「特徴1」を有するようにアミノ酸が付加、欠失、
15 もしくは置換されることが好ましい。また、一般的に「数個」とは、2～9の範囲の数を意味する。

本発明のポリペプチドが脳移行活性を示す対象となる生物は、血液脳関門を有する動物であれば特に制限されないが、通常、哺乳動物であり、好ましくは、マウス、ラット、スナネズミ、ネコ、ウシ、サル、もしくはヒトである。

20 また本発明のポリペプチドは、天然タンパク質由来ポリペプチド、組換えタンパク質由来ポリペプチド、または化学合成ポリペプチド等のいずれのポリペプチドであってもよい。当業者においては、任意のアミノ酸配列からなるポリペプチドを合成することが可能である。例えば、上記のモチーフ配列を含む、および／または上記「特徴1」を有するようなポリペプチドの合成は、当業者に公知の方法、例えば、市販のポリペプチド合成機等を利用して適宜実施することができる。
25 さらに本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に

- 18 -

含まれる。上記ポリヌクレオチドとは、通常、DNA または RNA の双方が含まれる。即ち、本発明のポリヌクレオチドをコードする DNA、および該 DNA の転写産物である RNA は、本発明に包含される。

本発明は、本発明のポリヌクレオチドが挿入されたベクター、本発明のポリヌクレオチドまたは該ベクターを保持する宿主細胞、および該宿主細胞を利用した本発明のポリペプチドの製造方法を提供する。

本発明のベクターとしては、挿入した DNA を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしては pBluescript ベクター (Stratagene 社製) などが好ましい。本発明のポリペプチドを生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でポリペプチドを発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であれば pBEST ベクター (プロメガ社製)、大腸菌であれば pET ベクター (Invitrogen 社製)、培養細胞であれば pME18S-FL3 ベクター (GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であれば pME18S ベクター (Mol Cell Biol. 8:466-472 (1988)) などが好ましい。ベクターへの本発明の DNA の挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。ポリペプチドを発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞 (例: ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌)、真菌細胞 (例: 酵母、アスペルギルス)、昆虫細胞 (例: ドロソフィラ S2、スポドプテラ SF9)、動物細胞 (例: CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes メラノーマ細胞) および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、

電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL 社製)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

- 5 宿主細胞において発現したポリペプチドを小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは目的のポリペプチドに対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。

- 本発明のポリペプチドの回収は、本発明のポリペプチドが培地に分泌される場合、
10 培地を回収する。本発明のポリペプチドが細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後にポリペプチドを回収する。

- 組換え細胞培養物から本発明のポリペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、
15 アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。

- 本発明のポリペプチドは脳移行活性を有することから、本発明のポリペプチドが結合した分子は脳移行活性を有することが期待される。本発明者らは、通常脳
20 移行活性を有しないファージ粒子が、その外殻タンパク質に本発明のポリペプチドを含むことにより、実際に脳移行活性を獲得することを示した。従って、本発明のポリペプチドは、任意の分子に対し結合することにより、任意の分子について脳移行活性を付与させる機能を有するものと考えられる。即ち本発明のポリペプチドは、他の分子に脳移行活性を付与し得る有用な用途を持つ。本発明は、本
25 発明のポリペプチドを含む、任意の分子に脳移行活性を付与するための薬剤を提供する。好ましい態様においては、上記のアミノ酸モチーフ配列、および/また

- 20 -

は上記「特徴 1」を有するポリペプチドを含む、脳に任意の分子を移行させるためのペプチドタグを提供する。

本発明の上記ペプチドタグの一例としては、後述の実施例に記載の本発明のペプチドとビオチンとのコンジュゲート分子を挙げることができる。該コンジュゲート分子は、アビジンと結合した任意の分子と、適宜結合させることができる。即ち、図 8 で示されるような構造を有する脳移行性ペプチドコンジュゲート分子、あるいは、後述の実施例によって具体的に使用されたコンジュゲート分子は、好ましい態様として本発明に含まれる。該コンジュゲート分子を用いることにより、アビジンと結合させた所望の分子を、脳へ移行させることが可能である。該コンジュゲート分子を用いた、任意の分子を脳へ移行させる方法もまた、本発明に含まれる。さらに本発明には、本発明の上記薬剤によって脳移行活性を付与された分子も含まれる。

本発明のポリペプチド（薬剤）によって脳移行活性を付与される分子は、特に制限されず、例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、糖鎖、タンパク質、ペプチド等の単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞、細胞抽出物、細胞培養上清、微生物、微生物産生物、ファージ、抗原、抗体、ミセル（高分子ミセル等）、リポソーム、マイクロカプセル、ペプチド核酸 (PNA)、医薬化合物等を挙げることができる。本発明のポリペプチドもしくは上記分子は必要に応じて適宜標識することも可能である。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識、酵素標識等を挙げることができる。

また、本発明のポリペプチドによって脳移行活性を付与される分子の大きさは、特に制限されないが、通常は、物理的に血液脳関門を通過しうる程度の大きさをも上限とする。後述の実施例で示すように、通常ファージ程度の大きさの分子も、本発明のポリペプチドの作用によって血液脳関門を通過することが可能である。従って、上記の付与される分子は、ファージと同等の大きさを呈する程度の分子（物質）であってもよい。例えば、上記の付与される分子がアミノ酸で構成され

- 21 -

る場合には、10万程度のアミノ酸を含有する分子であってもよい。

上記分子と本発明のポリペプチドとは、当業者においては、該分子の種類を考慮して適宜、公知の方法を利用して結合させることが可能である。

一例を示せば、市販のカップリング試薬（N-結合型、COOH-結合型、アミノ酸
5 残基修飾型、S-S結合型等）を用いる方法、クロラミンTを用いる方法、イソチアネート基を導入する方法等により、該分子と本発明のポリペプチドとを結合させることができる。

また、該分子がタンパク質である場合には、該タンパク質と本発明のポリペプチドとの融合タンパク質をコードするDNAを用いて、本発明のポリペプチドが
10 結合した分子を作製することも可能である。

より具体的には、以下の工程を含む方法によって作製することができる。

（a）発現可能な状態で任意のタンパク質分子をコードするDNAと、本発明のポリペプチドをコードするDNAとが結合した構造のDNAを含む発現ベクターを作製する工程

15 （b）前記発現ベクターを細胞へ導入する工程

（c）前記ベクターからの発現産物を回収する工程

また本発明は、本発明の脳移行活性を有するポリペプチドからなる脳送達用キャリアを提供する。該キャリアは、「担体」あるいは「運搬体」と表現することも可能である。本発明の脳移行活性を有するポリペプチド自体も、上記キャリア
20 の例として挙げることができる。即ち、本発明のポリペプチドと、脳へ移行させるべき分子とを直接結合させることによって、該分子を脳へ送達させることができる。また、本発明の上記キャリアの好ましい態様としては、例えば、本発明のポリペプチドが、ミセル（高分子ミセル）、リポソームまたはマイクロカプセルと結合した構造からなるキャリアを挙げることができる。

25 さらに、本発明のキャリアを利用することにより、所望の薬剤を脳へ移行させることが可能である。例えば、脳疾患に対して治療効果を有する化合物（医薬組

- 22 -

成物)を、上記キャリアに担持させることにより、該化合物を効率的に脳へ送達させ、有効な治療効果を発揮させることが可能である。該化合物(医薬組成物)を担持させたキャリア自体は、脳疾患治療剤として期待される。従って本発明は、本発明の上記脳送達用キャリアに薬物が担持された構造からなる、脳疾患治療剤

5 を提供する。なお、上記「担持された」とは、薬物をキャリアと直接結合させた状態でもよいし、薬物(医薬組成物)をキャリアに内包させた状態でもよい。

また本発明は、本発明の脳移行活性を有する分子の製造方法を提供する。本発明の製造方法の好ましい態様においては、任意の分子に本発明のポリペプチドを結合させる工程を含む、脳移行活性を有する分子の製造方法である。また、該分子がタンパク質である場合には、本発明は好ましい態様として、上記工程(a)

10 ～(c)を含む製造方法を提供する。

なお、本発明のポリペプチドは、脳移行活性を付与したい分子の外側に配置するように該分子と結合させることが好ましい。即ち、本発明のポリペプチドは、該分子の表面上へ配置されるように該分子と結合させることが望ましい。

15 本発明の好ましい態様においては、本発明のポリペプチドとして上記モチーフ配列を挟むようにシステイン残基(C)を配置させた配列を含むポリペプチドを挙げるができる。ポリペプチド中の2つのシステイン残基のSH基は、通常、自動酸化により架橋結合(ジスルフィド結合)することが知られている。このように2つのシステイン間で架橋結合が形成されることにより、その間に位置する

20 モチーフ配列を含むポリペプチド鎖はループ状に突出することが期待される。即ち、本発明のポリペプチドに上記のようなシステイン残基を導入することにより、効率的に本発明のポリペプチドを分子表面(外側)へ効率的に配置させることが可能となる。その他に、本発明のポリペプチドを外側へ配置させる方法として、例えば、ポリペプチド鎖を導入するタンパク質分子の外側に露出するドメインに

25 本発明のポリペプチドを配置させるように組換え体を作成する方法、PEGのような架橋剤をタンパク質、脂質、人工担体などに結合させ、PEG鎖の末端にポリペ

- 23 -

プチド鎖を結合させる方法、ポリペプチド鎖を担体表面に化学結合させる方法等が挙げられる。

本発明のポリペプチドと結合させる分子として、例えば、脳疾患の治療のために脳組織へ直接移行させることが望ましい化合物等を挙げることができる。該化合物は、本発明のポリペプチドによって脳移行活性が付与され、その結果、体内へ投与された際に効率的に脳組織へ移行し、治療効果を発揮することが期待される。

本発明には、上記のような脳疾患に対して治療効果が期待される脳移行活性を有する分子、または該分子を含む薬剤が含まれる。

10 本発明の脳移行活性を有するポリペプチドを用いた脳神経疾患の治療に対する治療戦略としては、例えば以下の場合に、本発明を適用することが可能である。

1) 欠損または変異などによって量や活性が低下した酵素や生理活性タンパク質を補う補充療法：

15 遺伝子欠損や遺伝子変異により特定の酵素またはタンパク質が脳内で欠乏することによって生じる様々な脳疾患に対し、欠乏するタンパク質や酵素の遺伝子を導入した細胞を注入することにより行われる。また、特定の神経細胞が変性脱落するパーキンソン病やアルツハイマー病に対し、神経の変性脱落により欠乏する神経伝達物質の合成を促進するような遺伝子、たとえばパーキンソン病におけるチロシン水酸化酵素やビオプテリン合成酵素などのドーパミン生合成系の酵素遺伝子が考えられる。

2) 変性などで脱落する神経細胞を保護し機能を強化する保護療法：

25 変性疾患や脳虚血など色々な原因で生じる神経細胞死を抑制し、神経突起の再生を促す神経栄養因子 (NGF, BDNF, GDNF, NT3 など。特にパーキンソン病では BDNF や GDNF が有効であることが近年示されている。) 遺伝子を発現する細胞を注入することにより行われる。また多発性硬化症のように免疫細胞が関与する疾患では免疫抑制作用がある TGF β や IL-10 遺伝

子を発現する細胞を導入することにより行われる。

3) 腫瘍や血栓などを除去するような方法：

抗腫瘍作用を持つ因子を発現させたり、抗がん剤を導入した細胞を脳に移入したりすることにより行なわれる。血栓除去については、線溶系の酵素を発現させることが考えられる。

4) 有効な薬物を脳にだけ導入するような方法：

神経系に作用する薬物は末梢毒性が高かったり、末梢神経系に作用を持つ物、血液脳関門を通過しにくい物など色々あり、脳への特異的なドラッグデリバリーシステムが必要とされていた。本発明のポリペプチドを用いることにより、末梢臓器にあまり影響を与えず脳に特異的に薬物投与ができると考えられる。

5) 脳疾患予防システムとしての利用法：

もともとミクログリアはその細胞の性質として変性や炎症部位に集まり死細胞を取り除き損傷修復にも関わったり、抗腫瘍作用や抗ウィルス作用を持つ、いわば脳内防御システムともいうべき細胞であることから、その性質を遺伝子操作などで強化することによって、単一疾患の治療だけでなく、脳内防御システムそのものの強化を行うことによってあらゆる疾患に対する予防措置にも応用しうると考えられる。

本発明の上記薬剤は、本発明のポリペプチドもしくは該ポリペプチドを含む脳移行活性を有する分子のみを成分とするものであってもよいし、また、公知の製剤学的製造法によって、製剤化することもできる。例えば、薬剤として一般的に用いられる適当な担体、または媒体、例えば滅菌水や生理食塩水、植物油（例、ゴマ油、オリーブ油等）、着色剤、乳化剤（例、コレステロール）、懸濁剤（例、アラビアゴム）、界面活性剤（例、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油系界面活性剤）、溶解補助剤（例、リン酸ナトリウム）、安定剤（例、糖、糖アルコール、アルブミン）、または保存剤（例、パラベン）、等と適宜組み合わせ、生体に

- 25 -

効果的に投与するのに適した注射剤、経鼻吸収剤、経皮吸収剤、経口剤等の医薬用製剤、好ましくは注射剤に調製することができる。例えば、注射剤の製剤としては、凍結乾燥品や、注射用水剤等で提供できる。

- 5 また体内への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、または経口的に当業者に公知の方法により行うことができるが、好ましくは動脈内投与である。

また本発明には、本発明の上記薬剤によって脳移行活性を付与された分子も含まれる。その一例を示せば、本発明のポリペプチドを外殻タンパク質上へ発現させたファージを好適に挙げることができる。

- 10 上記ファージは、特に制限されないが、例えば、T7ファージ、M13ファージ等を好適に示すことができる。T7ファージを用いる場合には、キャプシド (Capsid) と呼ばれる外殻タンパク質の外側に本発明のポリペプチドを提示させることができる。

- 本発明は、本発明のポリペプチドと結合する（好ましくは特異的に結合する）
15 抗体に関する。ここで「抗体」には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、さらに Fab または他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含む Fab フラグメントが含まれる。

- 本発明のポリペプチド、またはそれらを発現する細胞は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するための免疫原としても使用することができる。抗体
20 は、好ましくは、本発明のポリペプチドに免疫特異的である。「免疫特異的」とは、その抗体が他のポリペプチドに対するその親和性よりも本発明のポリペプチドに対して実質的に高い親和性を有することを意味する。

- 本発明のポリペプチドに結合する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、次のようにして得ることができる。本発明のポリペプチドあるいはその GST との融合タンパク質を
25 ウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫酸沈殿、プロテイン

- 26 -

A、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することにより調製する。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、本発明のポリペプチドをマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することで、調製することが可能である。

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドやこれを発現する細胞の単離、同定、および精製に利用することができる。また本発明のポリペプチドは、後述の本発明のポリペプチドに対し結合活性を有する分子のスクリーニング方法において好適に使用することができる。

本発明は、本発明のポリペプチドに対し結合活性を有する分子のスクリーニング方法を提供する。本発明の上記方法の好ましい態様においては、以下の工程（a）～（c）を含む方法である。

- 20 （a）本発明のポリペプチドと被検分子とを接触させる工程、
- （b）前記ポリペプチドと被検分子との結合活性を検出する工程、
- （c）前記ポリペプチドと結合する分子を選択する工程

本発明の上記スクリーニング方法によって、例えば、本発明のポリペプチドをリガンドとする受容体を取得することが可能である。該受容体は、脳の血管内皮細胞におけるトランスマイグレーションに関与することが期待される。本発明のスクリーニング方法によって取得される受容体の機能を解析することにより、ト

- 27 -

ランスマイグレーションのメカニズムの解明が大いに期待される。また、内皮細胞の細胞接着に関わる分子を取得することも可能であり、本発明のスクリーニング方法は非常に有用なものである。

上記工程 (a) における「接触」は、通常、本発明のポリペプチドの状態に応じて適宜、実施される。例えば、本発明のポリペプチドが精製された状態であれば、精製標品に被検分子（試料）を添加することにより行うことができる。また、本発明のポリペプチドが細胞内に発現した状態または細胞抽出液内に発現した状態であれば、それぞれ、細胞の培養液または該細胞抽出液に被検分子（試料）を添加することにより行うことができる。被検分子がタンパク質の場合には、例えば、該タンパク質をコードする DNA を含むベクターを、本発明のポリペプチドが発現している細胞へ導入する、または該ベクターを本発明のポリペプチドが発現している細胞抽出液に添加することによって行うことも可能である。

また、上記スクリーニング方法に用いる被検分子、もしくは本発明のポリペプチドは、必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識、酵素標識等が挙げられる。

上記結合活性の測定は、当業者においては周知の方法、例えば、酵母ツーハイブリッドシステムを利用した方法、免疫沈降を利用した方法等により、適宜実施することができる。タンパク質間の相互作用（結合活性）の測定方法としては、種々の方法が知られており、本発明の結合活性の測定についても、特定の方法に限定されるものではない。

一例を示せば、本発明のポリペプチドとの結合活性を評価する被検分子を含む試料、例えば、細胞の培養上清や細胞抽出物等を接触させ、その後、本発明の抗体を添加して、本発明のポリペプチドとともに該分子を免疫沈降させることが可能である。そして免疫沈降した産物の電気泳動度が本発明のポリペプチドのみの場合と比較して変化しているか否かに基づいて、被検分子と本発明のポリペプチドとの結合を検出することができる。また、結合が検出された試料からの被検分

- 28 -

子の回収は、本発明のポリペプチドとの結合を利用した方法、例えば、アフィニティークロマトグラフィーなどを用いて実施することができる。

さらに、本発明のポリペプチドと結合し得るタンパク質等の被検分子を発現していることが予想される組織もしくは細胞より、ファージベクターを用いた cDNA ライブラリーを作製し、これをアガロース上で発現させてフィルターにタンパク質を転写後、標識した本発明のポリペプチドを反応させ、結合する被検分子を発現しているプラークを検出する「ウエストウエスタンブロットティング法」によっても、本発明の方法を実施することができる。

また、固相などに固定させた本発明のポリペプチドに、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリー等を作用させ、結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニングにより候補化合物を単離する方法も、当業者においては通常行い得る技術である。

被検化合物としては、特に制限はなく、例えば、種々の公知化合物やペプチド、あるいはファージディスプレイ法等を応用して作成されたランダムペプチド群を用いることができる。本発明のポリペプチドを提示させたファージと、上記ランダムペプチド群を提示させたファージを用いた、所謂「ダブルファージディスプレイ法」(J. Castillo, B. Goodson and J. Winter: T7 displayed peptides as targets for selecting peptide specific scFvs from M13 scFv display libraries: J Immunol Methods: 257:1-2:117-22:2001) も本発明のスクリーニング方法に好適に利用することができる。

また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物などが挙げられるが、これらに特に制限されない。

また、通常遺伝子産物であるポリペプチドは、二本鎖DNAの一方の鎖によってコードされている。このとき、他方の鎖によってコードされると仮定したとき

- 29 -

のアミノ酸配列のペプチドはアンチセンスペプチドと呼ばれる。このアンチセンスペプチドは、本来のペプチド（センスペプチド）と相互反応をするという仮説が Blalock (1984) らにより提唱され、それ以後センスペプチドとアンチセンスペプチドが相互反応をするとする報告が多数知られている。従って、本発明のポリペプチドをコードする DNA の相補鎖配列に基づくアンチセンスペプチドを被検分子として、本発明のスクリーニング方法に供することにより、効率的に本発明のポリペプチドと結合する分子を取得することが可能である。

本発明のポリペプチドと結合する分子は、例えば、脳移行活性阻害剤、脳移行活性の増大や修飾の誘導剤、受容体本体（トランスマイグレーションを起こす分子）として有用である。

また本発明は、脳移行活性を有するポリペプチドの取得方法に関する。本発明の好ましい態様においては、以下の工程（a）～（d）を含む、脳移行活性を有するポリペプチドのスクリーニング方法（取得・単離方法）を提供する。

- （a）被検ポリペプチドをファージ外殻タンパク質上へ提示させたファージ粒子を作製する工程、
- （b）該ファージ粒子を、非ヒト動物へ投与する工程、
- （c）該非ヒト動物の脳組織からファージ粒子を回収する工程
- （d）工程（c）において回収されたファージ粒子に提示された被検ポリペプチドを脳移行活性を有するポリペプチドとして選択する工程

上記方法における被検ポリペプチドの配列は特に制限されず、任意のアミノ酸配列からなるポリペプチドを用いることができる。通常、本発明の被検ポリペプチドは、ランダムなアミノ酸配列からなる、複数種のポリペプチドである。また、本発明の上記方法においては、上記アミノ酸モチーフ配列もしくは該モチーフ配列の一部を含むようなポリペプチド、または上記「特徴1」を有するポリペプチドを被検ポリペプチドとして本発明のスクリーニング方法に供することにより、効率的に本発明の方法を実施することも可能である。

- 30 -

また、被検ポリペプチドの長さは、ファージ外殻タンパク質上へ提示させるのに許容される長さであれば特に制限されず、当業者においては、ファージの種類等を考慮して、被検ポリペプチドの長さを適切に設定することができる。

任意のアミノ酸配列からなるポリペプチドの作製は、当業者においては公知の
5 技術を用いて容易に行い得ることである。例えば、市販のペプチド合成機等を利用して被検ポリペプチドを作製することができる。

上記工程（a）において、任意のポリペプチドをファージ外殻タンパク質上へ提示させる方法は、所謂ファージディスプレイ法として当業者においては一般的に公知の技術である。ファージの生活環を利用して、任意のポリペプチドをファ
10 ージ外殻タンパク質上に提示させて、通常、ライブラリー化した分子群を調製する。一例を示せば、ランダム化した DNA を化学合成し、遺伝子工学技術を用いてファージ DNA に挿入する。この DNA を大腸菌等の宿主細胞へ導入することにより、ファージ分子が生合成され、ウィルス粒子の外殻タンパク質上へ上記ランダム化 DNA によってコードされるポリペプチドが提示される。

より具体的には、被検ポリペプチドをファージ外殻タンパク質上へ提示させた
15 ファージ粒子を作製する工程の一例として、後述の実施例に記載の方法（手順）を示すことができる。

本発明のスクリーニング方法に用いられるファージとしては、例えば、M13、T7、f1、fd 等の公知のファージを好適に用いることができる。ファージ外殻タ
20 ンパク質としては、例えば、pIII、10A、10B、Capcid 等を挙げることができる。pIII タンパク質上へ提示するライブラリー等は市販されており、本発明のスクリーニング方法においては、これらの市販のライブラリーを適宜使用することができる。

また、本発明の好ましい態様においては、工程（a）によって作製されたファ
25 ージ粒子に対し、工程（b）の前に予め、脳の血管内皮細胞と結合し得るファージ粒子をパンニングによって選択することができる。この操作により、本発明の

スクリーニングを効率的に行うことが可能である。

パンニング法は、タンパク質の相互作用を利用した選択方法であり、当業者においては、そのファージの種類等を考慮して適宜実施することができる。本発明のスクリーニング方法におけるパンニング法の利用例を示せば、まず、脳の血管
5 内皮細胞に結合しやすいファージを培養下で濃縮するために、対照細胞（マウスグリオーマ細胞）と反応して非特異的に結合するファージを吸収除去し、さらにマウス脳由来の血管内皮細胞（例えば、MBEC4）に特異的に接着するファージを濃縮する。より具体的には、後述の実施例に記載の手順によってパンニングを実施することができる。

10 上記工程（b）において、ファージ粒子を投与する非ヒト動物としては、例えば、マウス、ラット、スナネズミ、ネコ、ウシ、サル等を挙げることができる。その他、家畜動物あるいはペット動物等を挙げることができる。

また、上記工程（b）において投与されるファージは必ずしもファージ粒子全体である必要はなく、例えば、被検ポリペプチドを提示させた外殻タンパク質の
15 みを非ヒト動物へ投与することによっても、本発明のスクリーニングを行うことが可能である。

非ヒト動物体内への投与は、通常、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射、経皮投与、経口投与等により行うが、好ましくは動脈内注射である。

上記工程（c）において、脳組織からのファージ粒子の回収は、通常、以下の
20 ように行うことが可能である。非ヒト動物の脳を摘出し、脳のホモジネートの希釈シリーズを作製する。続いて、該希釈液を寒天培地上へ撒き、ファージのプラークを形成させた後、該プラークをピックアップし、ファージ粒子の回収を行う。ただし、この方法は一例であって、当業者においては、ファージの種類等を考慮して、適宜、脳組織からファージ粒子の回収を行うことができる。

25 次いで、上記工程（d）において選択されたポリペプチドは、当業者に公知の方法によってそのアミノ酸配列を決定することができる。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

図面の簡単な説明

- 5 図1は、trans-endothelial cell migrationのメカニズムを模式的に示した図である。
- 図2は、T7 Select Systemを用いたファージライブラリー構築を示す図および写真である。なお、写真は、cDNA断片をアガロースゲル上で分離したものである。インサートが無い場合、約120bpの断片が増幅されるが、ここでは200bp
- 10 から1kb近いインサートが確認できた。これは70-300アミノ酸に相当する。
- 図3は、T7 Select Systemを用いたファージライブラリーの構築（ランダムペプチド）を示す図である。
- 図4は、T7 Select Systemについて示す図である。
- 図5は、パンニング方法について示す図である。
- 15 図6は、配列番号：23または24の配列を有するファージの脳移行活性を示す写真である。
- 図7は、脳におけるファージの力価ならびに、脳/血漿比を示すグラフである。
- 図8は、本発明の脳移行性ペプチドコンジュゲートの構造を模式的に示す図である。
- 20 図9は、マウス脳における本発明のペプチド-金コロイドコンジュゲートの存在を示す電顕写真である。
- 左（上下）：コントロール群（アビジン-金コロイド）：神経細胞内に金コロイドの標識は観察されない。（上）：海馬錐体細胞（CA1～CA2領域）（下）：小脳プルキンエ細胞領域 中央（上下）：ビオチンコンジュゲートT2J002 + アビ
- 25 ジン(Av)-金粒子(gold)を投与。 右（上下）：ビオチンコンジュゲートT2J004 + アビジン(Av)-金粒子(gold)を投与。ペプチドコンジュゲートにより金コロ

- 33 -

イドを脳実質に運び込むことができた。

図10は、錐体細胞層(pyramidal cell layer)CA1-CA2における、本発明のペプチド-金コロイドコンジュゲートの存在を示す電顕写真である。

- 左：対照(control)群、(アビジン金コロイドのみ投与)血管内皮に反応が見られない。中央：Biotin + peptide (1)群：biotin-conjugated T2J002+Av-gold投与したもの。Biotin + peptide (2)群：pre-embedding method (biotin-conjugated T2J002を投与し、超薄切片作成後Av-goldで検出して観察)による免疫反応のEM像。Control群(左)では血管内皮に反応が見られないのに対し、実験群では内皮細胞に免疫反応を示すDABの沈着が認められる(矢印)。内皮細胞から、さらに血管外(脳実質)にもその反応が見られる。

図11は、本発明のペプチドコンジュゲートを用いた、MBEC4に対する透過性の評価実験の概略を模式的に示す図である。

- 図12は、本発明のペプチドコンジュゲート(T2J004)のMBEC4に対する透過性を示す図である。アビジン-FITC 0.4nmol/insertに対して、1:4の割合でペプチドを結合させMBEC4に対する透過性の経時的変化について検討した。

図13は、血液脳関門モデルでのペプチドコンジュゲートによる透過性の増大と非標識ペプチドによる阻害活性を示す図である。

- MBEC4を用いた血液脳関門モデルにAv-FITCおよびビオチンコンジュゲートT2J004Y+Av-FITCを添加して下層の蛍光強度を測定したところ、約3倍の透過性の増大が観察できた。この効果は環状化T2J004および直鎖状T2J004によって有意に阻害されることがわかった。

図14は、MBEC4におけるミクログリアまたはマクロファージの透過性の評価実験の概略を示す図である。

- 図15は、本発明の種々のペプチドコンジュゲートを用いた、MBEC4における透過性を示す図である。

図16は、4F11抗M13ファージ抗体によるリコンビナント脳移行性ファージ

- 34 -

の脳内検出を示す写真である。

脳移行性ファージ（上段）とコントロールファージ（下段）を血管内投与して30分後の摘出脳を4F11抗M13ファージ抗体で染色したところ、脳移行性ファージを投与したものでは脳内にファージ粒子を検出することができた。

- 5 左：NIBA フィルターによる特異結合の蛍光写真
中央：WIG フィルターによる非特異結合の検出
右：Hoechst 23384 による核染色（細胞の同定）

図17は、共焦点顕微鏡によるミクログリアのトランスサイトーシスの検出を示す写真である。

- 10 MBEC4 を用いた血液脳関門モデルにおいてミクログリアを添加して4時間後、トランスサイトーシスが検出できた。写真上に黄色～橙色に見えるミクログリアが緑色の血管内皮細胞を通過している像が観察できる。

図18は、血管内皮細胞にミクログリアを添加し1時間経過したときの位相差顕微鏡像（左）と蛍光顕微鏡像（右）の写真である。

- 15 図19は、トルイジンブルー染色後の光顕観察の結果の写真である。ミクログリア（左）とマクロファージ（右）したときのMBEC4血液脳関門モデルの垂直断面のトルイジンブルー染色を行った。

図20は、MBEC4の電子顕微鏡観察の結果を示す写真である。中央に見える黒い帯状の部分が密着帯（tight junction: 血液脳関門に特徴的に見られるバリア構造）。

- 20

図21は、ミクログリアが血液脳関門モデルを通過する際の電子顕微鏡像を示す写真である。

図22は、ミクログリアが血液脳関門モデルを通過する電子顕微鏡像を示す写真である。ミクログリアの突起が血液脳関門を形成するMBEC4細胞内へはつき

- 25

り陥入する像が見られる。

図23は、マクロファージ株化細胞 Raw264.7 のMBEC4 に対する接着を示す写

- 35 -

真である。マクロファージは血液脳関門を形成する MBEC4 に対して緩く接着するのみである。細胞層への透過は見られなかった。

図 2 4 は、マクロファージ株化細胞 Raw264. 7 の MBEC4 に対する接着を示す写真である。マクロファージは血液脳関門を形成する MBEC4 に対して緩く接着するのみである。細胞層への透過は見られなかった。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は、これに限定されるものではない。なお、PEG6000 は Wako より、トリプシン EDTA、ルリアブロス
10 ベース (Luria broth base)、ペニシリンストレプトマイシンは GIBCO より購入した。また、EDTA 2Na はナカライより、Agarose 36G はフナコシより、T7Select1-1Cloning kit は Novagen より購入した。

〔実施例 1〕 細胞の培養

15 (1) マウス 203 グリオーマ細胞

203 グリオーマ細胞は 10 % の FCS (GIBCO) と $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ インスリン (SIGMA)、0.22% グルコース (片山) を加えた MEM (SIGMA) 中で、 37°C で 5 % CO_2 の条件下で培養した。継代は 10 cm シャーレ (Falcon) に 2×10^5 cells / 7 ml で撒き、7 日毎に継代を行った。パンニング (panning) に使用する 203 グリ
20 オーマ細胞は、10 cm シャーレに 2×10^6 cells / 7 ml で撒き、4 日後にパンニングに使用した。

(2) マウス血管内皮 END-D 細胞

END-D 細胞は 10 % の非働化した FCS と 100 unit / ml ペニシリン、100 mg /
25 ml ストレプトマイシンを加えた DMEM (SIGMA) を用い、 37°C で 5 % CO_2 の条件下で培養した。継代は PBS (-) により 1 回洗浄した後、5ml の 0.25 % トリプシ

- 36 -

ン / 1mM EDTA 4Na を添加して 3 分静置し、5 ml の培地でフラッシングすることにより細胞を剥がした。続いて 1200 r. p. m. 5 分の遠心により細胞を沈殿させ、上清を除いて培地により 1 回洗浄した後 10 cm シャーレに 3×10^5 cells / 7 ml で撒き、3-4 日毎に継代を行った。パンニングに使用する END-D は、コラーゲンコートを行った 10 cm シャーレに 7 ml の培地中に 3×10^6 cells で撒き、4 日後にパンニングに使用した。コラーゲンコートは 10 cm シャーレに、 $5 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ のコラーゲン (新田ゼラチン (株)、cellmatrix type I-C) を加え 1 時間静置した後 PBS (-) で 2 回洗浄することで行った。

10 (3) マウス脳由来血管内皮 MBEC4 細胞

MBEC4 細胞は 10 % の FCS と $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ ヘパリン (SIGMA)、 $30 \mu\text{g} / \text{ml}$ ECG S (Endothelial cell Growth Supplement ; Upstate biotechnology) を加えた DMEM 中で、 37°C で 5 % CO_2 の条件下で培養した。継代は 0.2% ゼラチン (片山) でコートした 10 cm シャーレに 2×10^5 cells / 7 ml で撒き、3-4 日毎に継代を行なった。パンニングに使用する MBEC4 は、コラーゲンコートした 10 cm シャーレに 2×10^6 cells / 7 ml で撒き、4 日後にパンニングに使用した。

[実施例 2] M13 ファージディスプレイライブラリー

1. 大腸菌 ER2738 の培養

20 Ph. D. -c7c™ Phage Display Peptide Library Kit (New England Biolabs, E8 120S) に附属の宿主大腸菌 ER2738 を、 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ テトラサイクリン (片山) を含む LB 培地にて 37°C で一晩振盪培養し、 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ テトラサイクリンを含む LB プレートにストリークしたものを ER2738 のワーキングストック (Working stock) とし、2 週間毎に新たなワーキングストックを作製した。

25 ファージの増幅や力価測定に使用した ER2738 はこのストリークしたワーキングストックよりシングルコロニーをピックアップし、 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ テトラサイクリン

- 37 -

ンを含む LB 培地にて 37℃で一晩振盪培養した物を用いた。

2. *In vitro* パンニング

2-1. 細胞の固定

- 5 パンニングに使用する 203 グリオーマ細胞（対照として使用）、END-D 細胞、
MBEC4 細胞のシートが形成された 10 cm シャーレ各 1 枚ずつはそれぞれ、当日に
以下のように固定を行った。各細胞は培地を除去して 5 ml PBS (-) により 1 回
洗浄し、4% PFA（片山） / PBS (-) を 3 ml 添加して 10 分静置した後、5ml PBS
(-) により 3 回洗浄することで固定した。続いて、5ml の 2% BSA (SIGMA) / P
10 BS (-) を加え 4℃で 1 時間静置してブロッキングを行った。各細胞はファージ溶
液を添加する前に、3 ml の 0.1% Tween 20 / PBS (-) で 6 回洗浄してから使用
した。

2-2. 1 回目のパンニング

- 15 1 回目のパンニングでは、 10^{11} pfu の M13-c7c ファージライブラリー (10 μ
l) を 2ml の PBS (-) へ溶解し、全量を 203 グリオーマ細胞へ添加し、室温で 10
分間緩やかに振盪して吸着させた。続いて上清を END-D 細胞へ添加し、室温で 1
0 分間緩やかに振盪して吸着させた。続いて上清を MBEC4 細胞へ添加し、室温で
10 分間緩やかに振盪して吸着させた。各細胞は 10 分間の吸着処理後、5ml の 0.
20 1% Tween 20 / PBS (-) で 10 回洗浄した後、1mg/ml BSA を含んだ 0.2M Glycine
（Wako）-HCl (pH 2.2) を 2ml 添加して室温で緩やかに揺する事で抽出を行っ
た。抽出液の回収後、直ちに 0.2M Glycine-HCl (pH 2.2) 2ml でリンスして、
抽出液と共に 1M Tris-HCl (pH 9.1) を 1.6 ml 加えることで中和を行った。Tr
is は Boeringer より購入した。
25 各細胞からのファージ抽出液及び、各ステップでのファージの力価は、下記の
「2-2-1. ファージの力価測定」に示した方法により求めた。

- 38 -

さらに、MBEC4 細胞より抽出されたファージ溶液は、下記の「2-2-2. ファージの増幅と精製」に示した方法により増幅して 2 回目のパンニングに使用した。

2-2-1. ファージの力価測定 (Titration)

- 5 ファージ溶液の力価 (Titer) は以下のように測定した。

14ml スナップキャップチューブ (Falcon) に ER2738 の終夜培養液を 250 μ l と IPTG (片山) / X-gel (ナカライ) mixture (50 μ g/ml IPTG / 40 μ g/ml X-gel) を 3 μ l 加え、溶解した Top Agarose (6 μ g/ml Agarose / LB 培地) を 2.5 ml 添加して混合した。直ちに、LB/IPTG/X-gel plate に広げ、ER2378 laund plate を作製した。力価を測定するファージ溶液は TBS にて希釈シリーズを作製し、
10 ER2378 laund plate へ 10 μ l ずつプロットして、流れない程度まで乾燥させた後、37℃で一晩培養した。青く発色したプラークをカウントすることでファージ溶液の力価を算出した。

15 2-2-2. ファージの増幅と精製

バッフル付き三角フラスコを用いて、ER2738 の終夜培養液を 1/100 量添加した 20 μ g/ml テトラサイクリンを含む LB 培地に増幅するファージ溶液を加えて 37℃で 4.5 から 5 時間振盪培養した。続いて、10000 r. p. m. 10 分、4℃で遠心して上清を回収した。上清を 10000 r. p. m. 10 分、4℃で遠心する事で ER2738 を
20 完全に除いた。この上清に 1/6 量の 30% PEG / 3M NaCl (SIGMA) を添加して氷上で一晩静置してファージを沈殿させた。続いて 10000 r. p. m. 45 分 4℃で遠心して、上清をデカンテーションにより除去し、更に 10000 r. p. m. 10 分 4℃で遠心して、ファージの沈殿を集めた。ファージの沈殿は 2ml の TBS/ 0.02% Na₃ (SIGMA) で完全に溶解し、10000 r. p. m. 5 分、4℃で遠心して上清を回収し
25 た。上清に 0.467 g/ml になるように CsCl (Wako) を添加して 80000 r. p. m. 18 時間 15℃で密度勾配遠心を行い、精製されたファージのバンドを回収した。回

- 39 -

収した精製ファージは TBS で透析して CsCl を除去し、0.02% になるように NaN_3 を加えて 4℃ で保存した。

2-3. 2 回目のパンニング

- 5 2 回目のパンニングでは、 10^{10} pfu の M13-c7c ファージ混合液を 2ml の PBS (-) へ溶解し、全量を 203 グリオーマ細胞へ添加し、室温で 10 分間緩やかに振盪して吸着させた。続いて上清を END-D 細胞へ添加し、室温で 10 分間緩やかに振盪して吸着させた。続いて上清を MBEC4 細胞へ添加し、室温で 10 分間緩やかに振盪して吸着させた。各細胞は 10 分間の吸着処理後、5ml の 0.3% Tween 20 /
- 10 PBS (-) で 10 回洗浄した後、1mg/ml BSA を含んだ 0.2M Glycine-HCl (pH 2.2) を 2ml 添加して室温で緩やかに揺する事で抽出を行った。抽出液は回収し、直ちに 0.2M Glycine-HCl (pH 2.2) 2ml でリンスして、抽出液と共に 1M Tris-HCl
- 1 (pH 9.1) を 1.6 ml 加えることで中和を行った。

- 各細胞からのファージ抽出液及び、各ステップでのファージの力価は、上記
- 15 「2-2-1. ファージの力価測定」に示した方法により求めた。
- MBEC4 細胞より抽出されたファージ溶液は、上記「2-2-2. ファージの増幅と精製」に示した方法により増幅して *In vivo* パンニングに使用した。

3. *In vivo* パンニング

20 3-1. ファージの注入

- In vivo* パンニングには 8 週令のマウス雄の C57BL を使用した。 10^{11} pfu/300 μ l PBS の、上記の精製ファージをエーテル麻酔下のマウス左頸動脈より単回投与した。1 分後に 15mg/ml EDTA でコートしたツベルクリン用シリンジ (26G) を用いて心臓より採血し、直ちに 0.2g/ml EDTA/ PBS、400 ml にて灌流を行った。
- 25 灌流終了時に心臓内の灌流液を回収した。灌流後、脳を摘出し、各臓器より力価測定用と組織切片作成用に一部をサンプリングした。力価測定用には左脳を切片

- 40 -

作製用には右脳を使用した。

3-2. 組織サンプルの調製

力価測定用の組織は秤量し、2 倍量のホモジナイズ溶液 (20mM HEPES (SIGMA)
5 A) / 0.25M スクロース / 1mM EDTA に使用直前に 10 μ g/ml アプロチニン (Wako)、5 μ g/ml ロイペプチン (SIGMA)、1mM PMSF (Wako) を添加) を加え氷上でホモジナイズした。続いてホモジナイズ溶液と等量の 100mM LiCl (片山) / PBS を添加して混合した。

血液は 15000 r. p. m. 10 分 4℃で遠心し、血漿として回収し力価を測定した。
10 各組織のホモジネート、血漿、灌流液は、上記「2-2-1. ファージの力価測定」に示した方法でファージの力価を決定した。

脳のホモジネートは全て、上記「2-2-2. ファージの増幅と精製」に示した方法で増幅および精製を行い、次の *In vivo* パンニングに使用した。

15 4. ファージのクローニングおよび配列決定

4-1. クローニング

In vitro パンニングを 2 回と *In vivo* パンニングを 1 回行った脳のホモジネートもしくは、*In vivo* パンニングを 3 回行った脳のホモジネートよりファージのクローニングを行った。

20 脳のホモジネートの希釈シリーズを TBS で作製し、上記「2-2-1. ファージの力価測定」に記載の方法に従って、ファージのプラークを形成させ、シングルプラークを 1ml の TBS 中にピックアップした。この操作をもう一度行ってファージのクローニングを行った。

25 4-2. 配列決定 (sequencing)

14 ml スナップキャップチューブに 1ml の LB 培地と 10 μ l の ER2738 終夜培養

- 41 -

液とファージクローン溶液を 100 μ l 添加し、37℃で 4.5 時間振盪培養した。

5000 r. p. m. 5 分、4℃で遠心して ER2738 を沈殿させ、上清を 1.5ml エッペン
ンドルフチューブへ移し、10000 r. p. m. 1 分、4℃で遠心し上清を新しい 1.5ml
1 エッペンンドルフチューブに移した。続いて、30% PEG/ 3M NaCl を 400 μ l 添加
5 して転倒攪拌した後、4℃で一晩静置した。

13000 r. p. m. 30 分、4℃で遠心して上清をデカンテーションによって除き、
更に 13000 r. p. m. 30 分、4℃で遠心して、残った上清をアスピレートにより完全
に除去した。

沈殿したファージに 100 μ l の Iodided バッファー (4M NaI (SIGMA) /1mM E
10 DTA / 10mM Tris pH8.0) を添加してサスペンドする事で、完全にファージを溶
解させた。続いて 250 μ l のエタノールを添加して転倒攪拌し、室温で 10 分間
静置した。これを 15000 r. p. m. 10 分室温で遠心して上清を除去して、沈殿を 1
ml の 70% エタノールで緩やかに洗浄し 15000 r. p. m. 5 分、室温で遠心した。
上清をデカンテーションにより除去して、沈殿をデシケーターにて 5 分間乾燥
15 させた。この沈殿に 30 μ l の TE を添加して溶解し、これを配列のテンプレート
として使用した。配列決定は Ph. D. -c7c™ に附属の -28 gIII シーケンシングブ
ライマー (5' -GTA TGG GAT AAA CAA C-3' /配列番号: 13) と ThermoSequa
nce Cy5.5 Dyterminator kit (アマシャム) を用いて GeneRapid SEQ4x4 (アマ
シャム) で決定した。

20

5. ファージクローンの評価

得られたファージクローンは、上記の「2-2-2. ファージの増幅と精製」記載
の方法に従って、増幅と精製を行った。精製したファージクローンはファージの
投与量を 10^{10} pfu / 300 μ l に変え、上記「3. *In vivo* パンニング」記載の方法
25 に従って脳への移行性を力価を用いて評価した。コントロールファージとして M
13-KE (New England Biolabs, E8101S) (クローンナンバー1148) を使用した。

〔実施例 3〕 T7 ファージディスプレイライブラリー

1. T7 ファージディスプレイライブラリーの構築

ランダムな配列を含み、両端に EcoRI および HindIII の制限酵素サイトを加え、T7 ファージ 10B 遺伝子配列に組み込めるようにした 81 bp (415-15 : GAATCC ATGCAGAATTTC (XXK) 15AAGCCTGCTACAGACCAT / 配列番号 : 1 4) または 86bp (415-C 15C : GATCCATGCAGAATTCCTGC (XXK) 15TGCAAGCTTGCTACAGACCAT / 配列番号 : 1 5) のオリゴヌクレオチドを合成し、その約 1.3 μ g (50pmol) をテンプレートとして、5' および 3' 側のプライマー約 1.9 μ g (300pmol) を用いて PCR を行い、ランダムな配列を含む T7 ファージディスプレイライブラリー組み込み用インサートを作製した。作製したインサートを制限酵素 EcoRI および HindIII で消化してアガロースゲルで分離、精製し、pQE-TriSystem ベクターの EcoRI および HindIII サイトに組み込み、大腸菌で増幅して、ランダムな配列の確認を行った。確認後、大腸菌よりランダムな配列を含むプラスミドを精製して EcoRI および HindIII で消化し、目的の断片をアガロースゲルで分離、精製し、同様に EcoRI および HindIII で消化した T7 ファージの 10B 遺伝子配列に組み込んだ (図 2 および 3) 。10B 遺伝子配列への組み込み、ファージへの *in vitro* パッケージングは Novagen の T7 select Cloning kit のマニュアルに従い行った。なお、上記プライマー配列を下記に示す。

20 415-15 5' 側プライマー

GAATCCATGCAGAATTCC (配列番号 : 1 6)

415-15 3' 側プライマー

ATGGTCTGTAGCAAGCTT (配列番号 : 1 7)

415-C15C 5' 側プライマー

25 GATCCATGCAGAATTCCTGC (配列番号 : 1 8)

415-C15C 3' 側プライマー

- 43 -

ATGGTCTGTAGCAAGCTTGCA (配列番号 : 19)

2. 大腸菌 BL21、BLT5403 の培養

T7 Select415-1 Cloning kit (Novagen, 70015-3) に附属のホスト大腸菌 BL
21 もしくは BLT5403 を LB 培地にて 37℃で一晩振盪培養し、LB プレートにスト
リークした物を BL21 もしくは BLT5403 のワーキングストックとし、2 週間毎に
新たなワーキングストックを作製した。ファージの増幅や力価測定に使用した B
L21、BLT5403 はこのストリークしたワーキングストックよりシングルコロニー
をピックアップし、LB 培地にて 37℃で一晩振盪培養した物を用いた。

10

3. *In vitro* パンニング

3-1. 細胞の固定

パンニングに使用する 203 グリオーマ細胞 (対照として使用) のシートが形
成された 10 cm シャーレ 3 枚と、MBEC4 細胞 1 枚は、当日に以下のように固定
を行った。各細胞は培地を除去して 5 ml PBS (-) により 1 回洗浄し、4% PFA /
PBS (-) を 3 ml 添加して 10 分間静置した後、5ml PBS (-) により 3 回洗浄する
ことで固定した。続いて、5ml の 2% BSA / PBS (-) を加え 4℃で 30 分間静置し
てブロッキングを行った。ブロッキング溶液はファージの添加直前にアスピレー
トにより除いた。

20

3-2. パンニング

T7 Select 415-1 Cloning kit (Novagen) に両端をシステインで挟んだ 15 残
基のランダムペプチドを提示するようにインサートを組み込んだ物を作製し、こ
れを T7 Select 415-cl5c ライブラリーとした (図 4)。 *In vitro* パンニングで
は、 2×10^9 pfu の T7 select 415-cl5c ライブラリーを 2ml の PBS (-) へ溶解し、
4 cm シャーレに添加して全体に広げた後、全量回収して再度新しい 4 cm シャー

- 44 -

レに添加して全体に広げた。続いて全量回収した内の 1.1ml を新しいチューブに移し、2% Skim milk / PBS (-) を 1.1 ml 添加して室温で緩やかに 10 分間攪拌した。これを 10000 r.p.m. 10 分、4℃で遠心して得られた上清より 2ml を、上記「3-1. 細胞の固定」で示した方法により固定、ブロッキングを行った 1 枚目の 203 グリオーマ細胞へ添加して室温で 20 分間緩やかに振盪して吸着させた。続いて、上清を 2 枚目、3 枚目の 203 グリオーマ細胞へも同様に処理した。続いて、上清を MBEC4 細胞へ添加し、室温で 30 分間緩やかに振盪して吸着させた。上清をアスピレートにより除き、10ml の PBS (-) で 3 回洗浄した。続いて、2ml の 0.01% NP-40/ PBS (-) で 10 分間緩やかに振盪する洗浄を 3 回行った。次に 0.1 % NP-40/ PBS (-) に変え 1 回洗浄し、0.4ml の 0.1% SDS/ SM バッファーで 10 分間緩やかに振盪して、弱く結合しているファージを除去した。0.6ml の SM バッファーによりリンスした後、0.4ml の 0.5% SDS /SM バッファーで 10 分間緩やかに振盪して抽出し、0.6ml の SM バッファーでリンスした物と合わせて、親和性の低いファージ抽出液とし、続いて 1% SDS/ SM バッファーで 10 分間緩やかに振盪して抽出し、0.6ml の SM バッファーでリンスした物と合わせて親和性の高いファージ抽出液とした。パンニングの概略を図 5 に示す。

各ファージ抽出液及び、各ステップでのファージの力価は、下記「3-2-1. ファージの力価測定」に示した方法により求めた。力価測定には 100 倍以上の希釈倍率のファージ希釈溶液を元に力価を算出している。

さらに、MBEC4 細胞より抽出されたファージ溶液は、下記「3-2-2. ファージの増幅と精製」に示した方法により増幅して次のパンニングに使用した。

In vitro パンニングを 8 回行った後ファージのクローニングを行った。

3-2-1. ファージの力価測定

ファージ溶液の力価は以下のように測定した。

14ml スナップキャップチューブに BL21 もしくは BLT5403 の終夜培養液を 250

- 45 -

5 μ l 加え、溶解した Top Agarose (6 μ g/ml Agarose / LB 培地) を 2.5ml 添加
 して混合した。直ちに、LB plate に広げ、BL21 laund plate および BLT5403 l
 aund plate を作製した。力価を測定するファージ溶液は SM バッファーにて希釈
 シリーズを作製し、BL21 laund plate および BLT5403 laund plate へ 10 μ l ず
 10 つプロットして、流れない程度まで乾燥させた後、37℃で 2-4 時間培養して生
 じたプラークをカウントすることでファージ溶液の力価を算出した。上記実施例
 2 の「3. *In vivo* パンニング」で内部標準として使用している T7 rRNA : T7 se
 lect 1-1 kit (NEB, 70010-3) に rRNA の cDNA の一部 (5'-CAC CAA GCG TTG GAT
 TGT TCA CCC ACT AAT AGG GAA CGT GAG CTG GGT TTA GAC CGT CGT GAG ACA GG
 15 T TAG TTT TAC CCT ACT GAT GAT GTG TTG TTG CCA TGG TAA TCC TGC TCA GTA
 CGA GAG GAA CCG CAG GTT CAG ACA TTT GGT GTA TGT GCT TGG CTG AGG AGC CA
 A TGG GGC GAA GCT ACC ATC TGT GGG ATT ATG ACT GAA CGC CTC TAA GTC AGA
 ATC CCG CCC AG-3' / 配列番号 : 20) が組み込まれたファージは、BL21 では増
 殖できず、ホストに BLT5403 を用いた場合のみプラークを形成する。

15

3-2-2. ファージの増幅と精製

バッフル付き三角フラスコを用いて、BL21 の終夜培養液を 1/100 量添加した
 LB 培地を 37℃で 2-3 時間振盪培養して、増幅するファージ溶液を加えて更に 1-
 3 時間振盪培養した (溶菌した大腸菌のデブリスの量と濁度の低下で判断)。続
 20 いて、10000 r. p. m. 10 分、4℃で遠心して上清を回収した。

この上清に 1/2 量の 30% PEG / 3M NaCl を添加して氷上で一晩静置してファ
 ージを沈殿させた。続いて 10000 r. p. m. 45 分、4℃で遠心して上清をデカンテ
 ーションにより除去し、更に 10000 r. p. m. 10 分、4℃で遠心してファージの沈
 殿を集めた。ファージの沈殿は 2ml の SM バッファーで完全に溶解し、10000 r.
 25 p. m. 5 分、4℃で遠心して上清を回収した。上清に 0.5 g/ml になるように CsCl
 を添加して 80000 r. p. m. 18 時間 15℃で密度勾配遠心を行い、精製されたファ

- 46 -

ージのバンドを回収した。回収した精製ファージは SM バッファーで透析して CsCl を除去し、Chloroform を数滴加えて 4℃ で保存した。

4. クローニング

- 5 8 回目の *In vitro* パンニングのファージ抽出液の希釈シリーズを SM バッファーで作製し、上記「3-2-1. ファージの力価測定」の方法に従って、ファージのプラークを形成させ、シングルプラークを 1ml の SM バッファー中にピックアップした。この操作をもう一度行ってファージのクローニングを行った。

10 5. 配列決定

- 上記ファージクローンの一部を MilliQ 水で 100 倍希釈して 95℃ で 5 分加熱後、直ちに氷冷した物を PCR のテンプレートとした。このテンプレートを 1μl 加え、プライマーとして 5'-GCT CTG CGG TAG GTA CTG TT-3' (配列番号: 2 1) と 5'-CGG TGC CCC AAA GAA TCG GT-3' (配列番号: 2 2) を 1μM で添加して、30 μl のサイズで以下のように PCR を実施した。94℃ 1分、60℃ 1分、72℃ 2分
15 で 40 サイクル反応を行った。続いてエタ沈により PCR 産物を沈殿させ、10μl の TE に溶解した。続いて CHROMA SPLIN+TE30 Column (Clontec, K1321-2) を用いてカラム精製した PCR 産物を配列のテンプレートとした。

- 配列サンプルは ThermoSequence Cy5.5 Dyterminator Kit (アマシャム) を
20 用いて調製し、GeneRapid SEQ4x4 にて配列を決定した。

ファージのクローンは、上記「3-2-2. ファージの増幅と精製」に示したように精製して *In vivo* での評価に用いた。

6. ファージクローンの評価

25 6-1. ファージの注入

In vivo パンニングには 8 週令のマウス雄の C57BL を使用した。1 時間の UV

- 47 -

照射により滅菌した精製 T7 select 415-cl5c library 4×10^6 pfu/200 μ l PBS をエーテル麻酔下のマウス左頸動脈より投与してマスキングを行った。続いて 5 分後に精製 T7 select 415-cl5c クローンと内部標準として T7 rRNA を 4×10^6 pfu ずつ含んだファージ混合液を 200 μ l 投与した。1 分後に 15mg/ml EDTA でコー
5 トしたツベルクリン用シリンジ (26G) を用いて心臓より採血し、直ちに 0.2g/ml EDTA/ PBS、400 ml にて灌流を行った。灌流終了時に心臓内の灌流液を回収した。灌流後、脳を摘出し、各臓器より力価測定用と組織切片作成用に一部をサンプリングした。力価測定用には左脳を切片作製用には右脳を使用した。

10 6-2. 組織サンプルの調製

力価測定用の組織は秤量し、2 倍量のホモジナイズ溶液 (20mM HEPES / 0.25 M スクロース/ 1mM EDTA に使用直前に 10 μ g/ml アプロチニン、5 μ g/ml ロイ
ペプチン、1mM PMSF を添加) を加え氷上でホモジナイズした。続いてホモジ
ナイズ溶液と等量の 100mM LiCl/ PBS を添加して混合した。

15 血液は 15000 r. p. m. 10 分 4℃で遠心し、血漿として回収し、力価を測定した。

各組織のホモジネート、血漿、灌流液は、上記「3-2-1. ファージの力価測定」に示した方法でファージの力価を決定した。

上記の組織サンプルより、各臓器に親和性を有する組み換えファージを分離し
20 た。このうち、脳より回収されるファージを増殖させ、再度マウスの尾静脈から注入し、上記同様の分析を行った。その結果として、いくつかの陽性クローンが分離できた。代表的な配列を以下に示す。

配列 1 : MLGDPN-CVKQAVQSSVKHPDLSC-KLAAALE (配列番号 : 2 3)

配列 2 : MLGDPN-CPRGLPVTTTLMEKSKC-KLAAALE (配列番号 : 2 4)

25 これらの配列を有するファージクローンを、マウスに注入した。その結果、脳に局在化させることができた (図 6、7)。以上の方法で、脳特異的に侵入する

- 48 -

分子の候補が単離できた。

さらに同様の方法で、脳以外の臓器を特異的に標的化できる分子も単離できると考えられる。実際に図7に示すように、脳以外の臓器に親和性を有するファージが分離できた。

5

[実施例4] 脳移行性ペプチドコンジュゲート

本発明者は、脳移行性ペプチドコンジュゲートの作製を行った。該コンジュゲートは、本発明のペプチド分子中のシステイン残基同士のジスルフィド結合によって、環状構造をとり得るものであり、さらにビオチンが付加された分子である。

10 より具体的には、図8に示す構造を例示することができる。該コンジュゲートは、アビジン化合物と結合能を有する。

上記コンジュゲートは、金コロイドと結合させてマウスへ投与し、本発明のペプチドの脳移行活性を評価する実験（透過電子顕微鏡による脳組織切片の観察）に供した。透過電子顕微鏡試料作成プロトコルを表2に示す。

15 (表2)

[ブロック作成]

・前固定 2.5%グルタルアルデヒド溶液 in 0.1M PB 4℃ →

・洗い 0.1M PBS 1~2回 氷冷 →

・後固定 1%四酸化オスミウム溶液 in 0.1M PB 氷冷 約1時間 →

20 ・脱水 エタノールシリーズ 70→80→90→95→100→100→100 (%) 各10分 →

・樹脂包埋 Epok812 樹脂重合 35℃ 12時間 → 45℃ 12時間 → 60℃ 20時間 →

・ブロックの完成

25

[切片作成]

- 49 -

- ・トリミング →
 - ・ガラスナイフで厚切り切片 (2~3 μ m 厚) 作成 →
 - ・ダイヤモンドナイフで (超薄切片 50~100nm 厚) 作成 →
 - ・電子染色 2%酢酸ウラン → 1%クエン酸鉛 各3分 →
- 5 ・透過電子顕微鏡観察 加速電圧 80kV

本実験においては、本発明のペプチドとして、T2J002 (配列番号：2) および T2J004 (配列番号：4) を用いた。マウス脳組織 (細胞) の電子顕微鏡写真を図 9、10 に示す。矢印が金粒子と結合した本発明のペプチド分子の存在位置を表す。その結果、本発明のペプチドコンジュゲートにより、金コロイドを脳実質に運び込むことに成功した。即ち、本発明のペプチドは、脳移行活性を有することが確認された。

10

〔実施例 5〕 T2J004Y-Biotin 透過実験

- 15 試薬は以下のものを用いた；ストレプトアビジン (Streptavidin), FITC コンジュゲート (ベクター 1.0mg/ml)、T2J004Y-Biotin、DMEM (SIGMA) 10%FBS (GIBCO lot. 1077859) MBEC4 実験用、DMEM 10%FBS (GIBCO lot. 1077859 : 65℃ 30 分 inactivated) END-D 実験用。(上記「T2J004Y-Biotin」は、配列番号：4 に示すポリペプチドを有する。)
- 20 まず、MBEC4 (1.26×10^4 / insert)、END-D (2×10^4 / insert) を FALCON [35] 3096 cell culture inserts 3.0 μ m pore size に播き込み、37℃、5%CO₂ 下で 4 日間培養した。
- 25 ストレプトアビジン、FITC コンジュゲート (25 μ l / insert) と T2J004Y-Biotin (1.6nmol / insert) を混合し、室温で 30 分間インキュベートした。その後、各培養液で 250 μ l に調製し、insert 中の培養液と置き換え、well (FALCON 24well セルカルチャーインサート用プレート) には 750 μ l の培養液

- 50 -

を加えた。3 時間、6 時間、24 時間後に well 中から 100 μ l サンプルングし、Fluorskan Ascent (Thermo Labsystems) を用いて、蛍光強度を測定した。図 11 に、本実験の概略を示す。

その結果、FITC のみの場合に比べ、T2J004Y-Biotin と conjugate させたものは MBEC4 では約 8 倍、END-D では約 4 倍の透過が見られた。また、ペプチドが MBEC4 において、END-D に比べ 2 倍量以上透過していることがわかり、透過量は経時的に増加していた。

〔実施例 6〕 MBEC4 における T2J004Y-Biotin 添加量と透過量の相関

10 アビジン (Avidin) とビオチン (Biotin) は 1 : 4 の割合で結合する。そこで、ストレプトアビジン FITC と反応させる T2J004Y-Biotin の割合を変え、MBEC4 における透過量を検討した。

試薬は以下のものを用いた ; ストレプトアビジン, FITC コンジュゲート (VECTOR 1.0mg/ml) 、T2J004Y-Biotin、DMEM 10%FBS。

15 まず、MBEC4 (1.26×10^4 / insert) で播き込み、37℃、5%CO₂ 下で 4 日間培養した細胞に、Streptavidin, FITC conjugate (25 μ l / insert) に対し、1.6 (nmol / insert)、0.4 (nmol / insert)、0.2 (nmol / insert) の量の T2J004Y-Biotin を混合し、室温で 30 分間インキュベートし、混合液を培養液で 250 μ l に調製し、insert 中の培養液と置き換えた。well には 750 μ l の培養液を加え、
20 3 時間、6 時間後に Fluorskan Ascent を用いて、蛍光強度を測定した。

その結果、透過してきたペプチドの量は、添加したペプチドの量と相関していたが、0.4 nmol / insert のペプチドを添加した場合に対し、4 倍の 1.6 nmol / insert のペプチドを加えても、透過したペプチドの量は約 2 倍程度であった。

このことから 1.6 nmol / insert のペプチドは、insert の有効培養面積

25 (0.3cm²) の MBEC4 のシートを 6 時間で透過するペプチドの量としては十分量であることが示唆される (図 12) 。

- 51 -

〔実施例7〕 ペプチドによる T2J004Y-Biotin 透過の阻害

ビオチン標識のないペプチドの前処理によって、T2J004Y-Biotin-FITC の透過が阻害されるか検討した。

- 5 試薬は以下のものを用いた；Streptavidin, FITC conjugate (VECTOR 1.0mg/ml)、T2J004Y-Biotin、DMEM 10%FBS MBEC4 実験用、CT2J004Y、LT2J004Y。（「CT2J004Y」は環状を、「LT2J004Y」は直鎖状の構造の分子を表す。なお、該環状は、該分子に含まれるシステイン残基同士のジスルフィド結合による）
- 10 まず、Biotin 標識のないペプチド各 10nmol / insert を培養液 (200 μ l / insert) に混合し、上記の条件で 4 日間培養しておいた insert の培養液と置き換えた。30 分後に、先ほどと同様にして混合しておいたペプチド-FITC の混合液を、培養液で 50 μ l に調製し、insert に添加した。6 時間後に 24well 内をよく攪拌し、Fluorskan Asen で蛍光強度を測定した。
- 15 その結果、CT2J004Y、LT2J004Y で、どちらも其々およそ 25% T2J004Y-Biotin-FITC の透過を抑えていた (図 13)。

〔実施例8〕 ファージの前処理によるミクログリアの透過阻害

- 20 試薬は以下のものを用いた；PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit For general cell membrane labeling (SIGMA)、DMEM 10%FBS。

- まず、MBEC4 (1.26×10^4 cells / insert) を播き込み、37℃、5%CO₂ 下で 4 日間培養した insert に、コントロール及び、脳移行性ペプチドを提示したファージ (10^{13} pfu / ml) 5 μ l を添加し、1 時間前処理をした。ミクログリアの細胞膜を PKH26 で染色した後、 2×10^5 (cells / insert) づつ、DMEM 10%FBS で 250 μ l
- 25 に調製し、加えた。well には 750 μ l の培養液を加え、24 時間後に、well の底、

- 52 -

および培養液中のミクログリアの数をカウントした。図14は、本実験の概略を示す。

その結果、コントロールファージに比べ、脳移行性ペプチドを提示しているファージでは、MBEC4におけるミクログリアの透過を、若干阻害しているようであった。明確な差が得られなかったのは、MBEC4側のレセプターの数に対し、リガ
5 ンドであるファージやミクログリアの数が少なかった可能性が考えられる。

〔実施例9〕 他のペプチドと T2J004Y-Biotin の透過性の比較

試薬は以下のものを用いた；ストレプトアビジン, FITC コンジュゲート
10 (VECTOR 1.0mg/ml)、T2J004Y-Biotin、T2J002Y-Biotin、T2J003Y-Biotin、
DMEM 10%FBS MBEC4。

まず、MBEC4 (1.26×10^4 / insert) を insert に播き込み、37℃、5%CO₂ 下で4日間培養した。ストレプトアビジン, FITC コンジュゲート (25μl / insert) と
T2J004Y-Biotin、T2J002Y-Biotin、T2J003Y-Biotin (各々1.6nmol / insert) を
15 混合し、室温で30分間インキュベートした。その後、各培養液で250μlに調製し、insert中の培養液と置き換え、well (FALCON 24well セルカルチャーインサート用プレート) には750μlの培養液を加えた。3時間、6時間、24時間後にwell中から100μlサンプリングし、Fluorskan Asentを用いて、蛍光強度を測定した。

20 その結果、MBEC4におけるT2J004Y-Biotinの透過性を100とした場合の、T2J002Y-Biotin、T2J003Y-Biotinの透過する割合を示した。T2J002Y-Biotinは、T2J004Y-Biotinの20~40%程しか透過しなかったが、T2J003Y-Biotinはおよそ1.4倍多く透過していた(図15)。

25 〔実施例10〕 本発明のペプチドを発現するファージの脳移行活性

- 53 -

本発明のペプチドを発現するファージと、コントロールファージを血管内に投与し、脳移行活性の検討を行った。

その結果、本発明のペプチドを発現するファージ粒子を脳内に検出することができた（図16）。

5

〔実施例11〕 ミクログリアの細胞のトランスサイトーシス活性

MBEC4を用いた血液脳関門モデルにおいて、ミクログリアのトランスサイトーシス活性を観察した。

その結果、ミクログリアを添加して4時間後、トランスサイトーシスが検出できた（図17）。

10

また、ミクログリアが血液脳関門モデルを通過する際のトランスサイトーシス活性を電子顕微鏡を用いて観察した。

その結果、ミクログリアの突起が血液脳関門を形成するMBEC4細胞内へはつきり陥入する像が観察された（図21、22）。

さらに対照実験として、マクロファージについて同様の実験を行った。その結果、マクロファージは血液脳関門を形成するMBEC4に対して緩く接着するのみであり、細胞層への透過は見られなかった（図23、24）。

15

産業上の利用の可能性

本発明者らによって、脳移行活性に関与するアミノ酸モチーフ配列が初めて見出され、該モチーフ配列を含むポリペプチドは脳移行活性を有することが新たに見出された。本発明のポリペプチドは脳の血管内皮細胞に特異的に結合し、さらに、trans cellular pathwayを誘導することにより、物質を脳実質に送り込むことが可能になった。

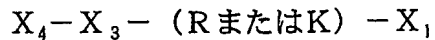
20

- 54 -

請求の範囲

1. 塩基性アミノ酸残基（KまたはR）を10%以上含有する、脳移行活性を有するポリペプチド。
- 5 2. 環状ペプチド領域を有するポリペプチドであって、該環状ペプチド領域において塩基性アミノ酸残基（KまたはR）が10%以上含まれる、脳移行活性を有するポリペプチド。
3. 環状ペプチド領域を有するポリペプチドであって、該環状ペプチド領域に少なくとも1以上の塩基性アミノ酸残基（KまたはR）を有する、脳移行
10 活性を有するポリペプチド。
4. 環状ペプチド領域を有するポリペプチドであって、該環状ペプチド領域に少なくとも1以上の塩基性アミノ酸残基（KまたはR）を有し、かつ、該環状領域の残りのアミノ酸残基のうち80%以上が以下のアミノ酸残基から選択されることを特徴とする、脳移行活性を有するポリペプチド。
15 G、A、V、L、S、T、P、Q、H、N
5. 以下のアミノ酸モチーフ配列を含むポリペプチドであって、脳移行活性を有するポリペプチド。
 $X_1 - (R \text{ または } K) - X_3 - X_4$ 、または
 $X_4 - X_3 - (R \text{ または } K) - X_1$
20 式中、 X_1 はS、T、N、P、VまたはL、 X_3 は任意のアミノ酸、 X_4 はG、S、T、C、N、L、Q、またはYを表す。
6. 環状領域に請求項5に記載のアミノ酸モチーフ配列が含まれる、請求項2～4のいずれかに記載のポリペプチド。
7. アミノ酸モチーフ配列が以下の配列である、請求項5または6に記載のポリ
25 ペプチド。
 $X_1 - (R \text{ または } K) - X_3 - X_4$ 、または

- 55 -



式中、 X_1 はS、T、N、PまたはV、 X_3 は任意のアミノ酸、 X_4 は非電荷極性アミノ酸(G、S、T、C、N、Q、Y)を表す。

8. アミノ酸モチーフ配列が以下の配列である、請求項5または6に記載のポリペプチド。
- 5 $X_1-(R \text{ または } K)-X_3-X_4$ 、または
 $X_4-X_3-(R \text{ または } K)-X_1$
 式中、 X_1 はS、T、PまたはL、 X_3 は任意のアミノ酸、 X_4 はS、T、C、L、またはQを表す。
- 10 9. トランスマイグレーション誘導活性を有する、請求項1～8のいずれかに記載のポリペプチド。
- 10 10. 脳の血管内皮細胞と結合する活性を有する、請求項1～8のいずれかに記載のポリペプチド。
- 11 11. 以下の(a)～(c)のいずれかに記載のポリペプチド。
- 15 (a) 配列番号：1～12のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (b) 前記(a)のポリペプチドの両端のシステイン同士のジスルフィド結合によって環状化されたペプチド領域を含む、ポリペプチド。
- (c) 配列番号：1～12のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1または
- 20 数個のアミノ酸が付加、欠失、もしくは置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、脳移行活性を有するポリペプチド。
12. ポリペプチドの長さが9アミノ酸以内である、請求項1～11のいずれかに記載のポリペプチド。
13. 請求項1～12のいずれかに記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- 25 14. 請求項1～12のいずれかに記載のポリペプチドと結合する抗体。

- 56 -

15. 請求項1～12のいずれかに記載のポリペプチドを含有する、任意の分子に脳移行活性を付与するための薬剤。
16. 任意の分子が任意のポリペプチドである、請求項15に記載の薬剤。
17. 請求項1～12のいずれかに記載のポリペプチドを含む、脳移行活性を
5 有する分子。
18. 分子がファージ粒子、または該ファージ粒子の外殻タンパク質である、請求項17に記載の分子。
19. 分子が請求項1～12のいずれかに記載のポリペプチドとの融合タンパク質である、請求項17に記載の分子。
- 10 20. 請求項1～12のいずれかに記載のポリペプチドからなる、脳送達用キャリア。
21. 請求項1～12のいずれかに記載のポリペプチドが、ミセル、リボソームまたはマイクロカプセルと結合した構造からなる、脳送達用キャリア。
22. 請求項20または21に記載の脳送達用キャリアに薬物が担持された構造からなる、脳疾患治療剤。
15
23. 任意の分子に請求項1～12のいずれかに記載のポリペプチドを結合させる工程を含む、脳移行活性を有する分子の製造方法。
24. 以下の工程(a)～(c)を含む、脳移行活性を有するタンパク質分子の製造方法。
- 20 (a) 発現可能な状態で任意のタンパク質分子をコードするDNAと、請求項1～12のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNAとが結合した構造のDNAを含む発現ベクターを作製する工程
- (b) 前記発現ベクターを細胞へ導入する工程
- (c) 前記ベクターからの発現産物を回収する工程
- 25 25. 以下の工程(a)および(b)を含む、任意の分子を非ヒト動物の脳へ移行させる方法。

- 57 -

- (a) 任意の分子と請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載のポリペプチドとが結合した構造の脳移行活性を有する分子を製造する工程
- (b) 前記分子を非ヒト動物体内へ投与する工程
26. 以下の工程 (a) ～ (c) を含む、請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の
5 ポリペプチドに対して結合活性を有する分子のスクリーニング方法。
- (a) 請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載のポリペプチドと被検分子とを接触させる工程
- (b) 前記ポリペプチドと被検分子との結合活性を検出する工程
- (c) 前記ポリペプチドと結合する分子を選択する工程
- 10 27. 以下の工程 (a) ～ (d) を含む、脳移行活性を有するポリペプチドのスクリーニング方法。
- (a) 被検ポリペプチドをファージ外殻タンパク質上へ提示させたファージ粒子を作製する工程
- (b) 該ファージ粒子を、非ヒト動物へ投与する工程
- 15 (c) 該非ヒト動物の脳組織からファージ粒子を回収する工程
- (d) 工程 (c) において回収されたファージ粒子に提示された被検ポリペプチドを脳移行活性を有するポリペプチドとして選択する工程
28. 被検ポリペプチドが請求項 5、7 または 8 のいずれかに記載のアミノ酸モチーフ配列を含む、請求項 27 に記載のスクリーニング方法。
- 20 29. ファージが M13 ファージまたは T7 ファージである、請求項 27 に記載のスクリーニング方法。
30. 工程 (a) につづいて、さらに、脳の血管内皮細胞と結合するファージ粒子を選択する工程、を含む請求項 27 に記載のスクリーニング方法。

図 1

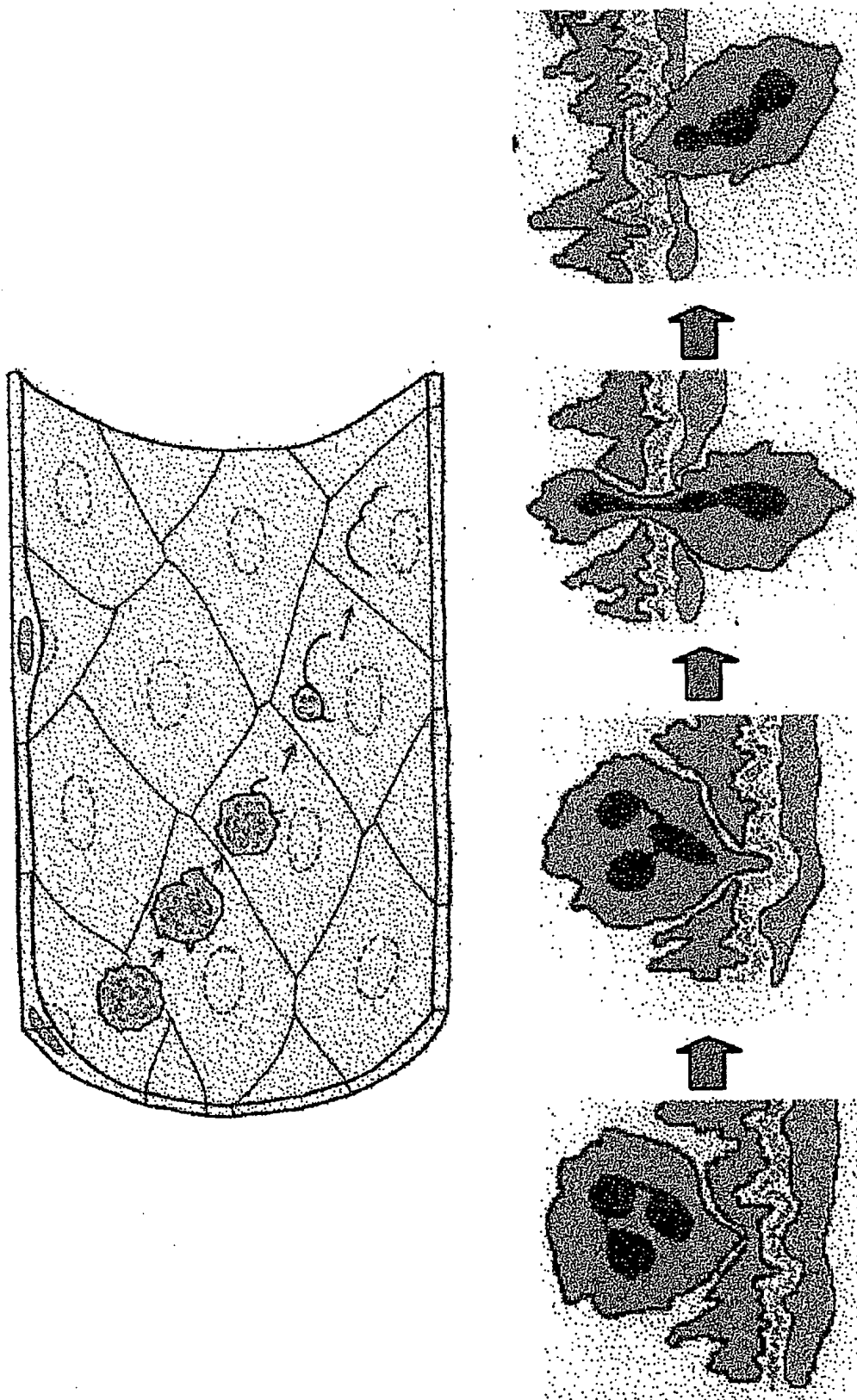


图 3

T7Select415-1b, T7Select1-1b クローニング部位

キャプシドタンパク質10B 遺伝子

aa348

.....Met Leu Gly Asp Pro Asn Ser Ser Val Asp Lys Leu Ala Ala Leu Glu

.....ATG CTC GGG GAT CCG AAT TCG AGC TCC GTC GAC AAG CTT GCG GCC GCA CTC GAG TAA

BamHI EcoRI SacI HindIII NotI

・合成オリゴ-1 (84mer)

45 塩基, (15 a.a.)

GCCCAGCGGCCAATTGCNNKNNK—NNKNNKTGCAAGCTTGCGGCCGACGGT

Asn Cys X X X Cys Lys Leu
Mun I Hind III

・合成オリゴ-2 (81mer)

45 塩基, (15 a.a.)

CAGCCGGCCTCGAATTCNNKNNK—X X X Lys Leu
Asn Ser X X X
EcoR I | Hind III
NNKNNAAGCTTGCGGCCGACAGGT

N: G, A, T, C 混合物
K: G, T 混合物

終止コード出現頻度 1/32 / コドン

PCR增幅
制限酵素消化

図 5

パンニング方法

- ・ タンパク質の相互作用を利用した選択方法。

- 細胞表面へ吸着する物を選択的に濃縮
- 重要な
 - ・ 担体の選択
 - ・ 吸着条件
 - ・ な結合の除去

- フアージ VS 細胞
- フアージ VS たんぱく質 または溶解物

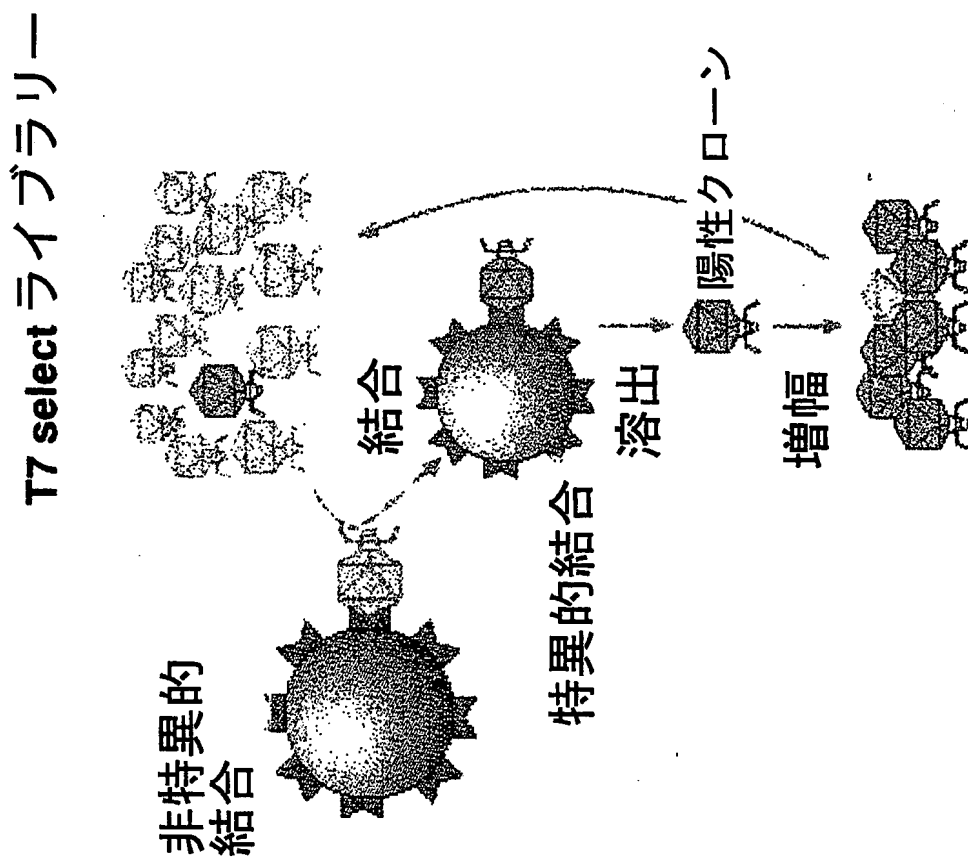


図 6

スケジュール

020425: コントロールファージ (No.145)を尾静脈 へ注入

Expファージを尾静脈へ注入: (No.89 (#2と同様のアレンジメント))

↓

安楽死5分後, 安楽死60分後

(脳, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 精巣)

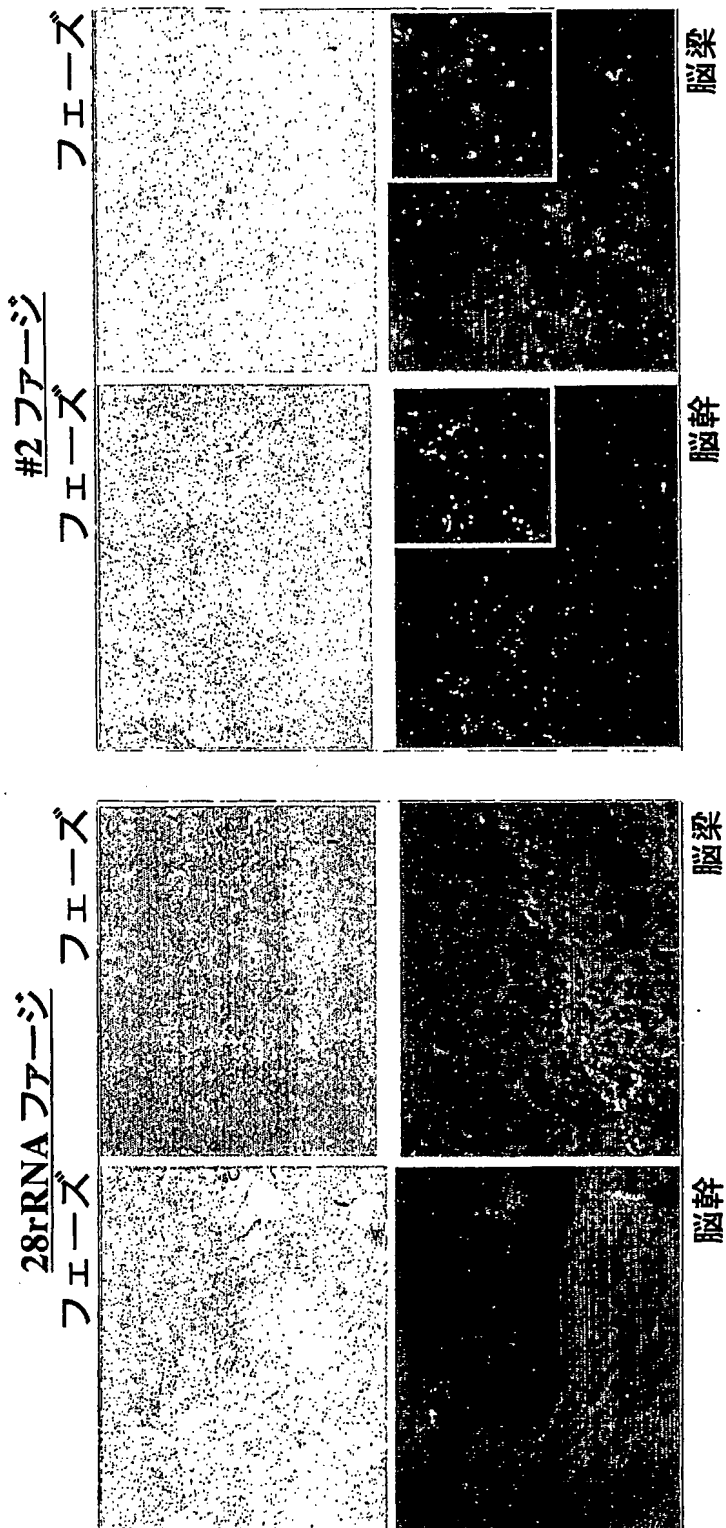
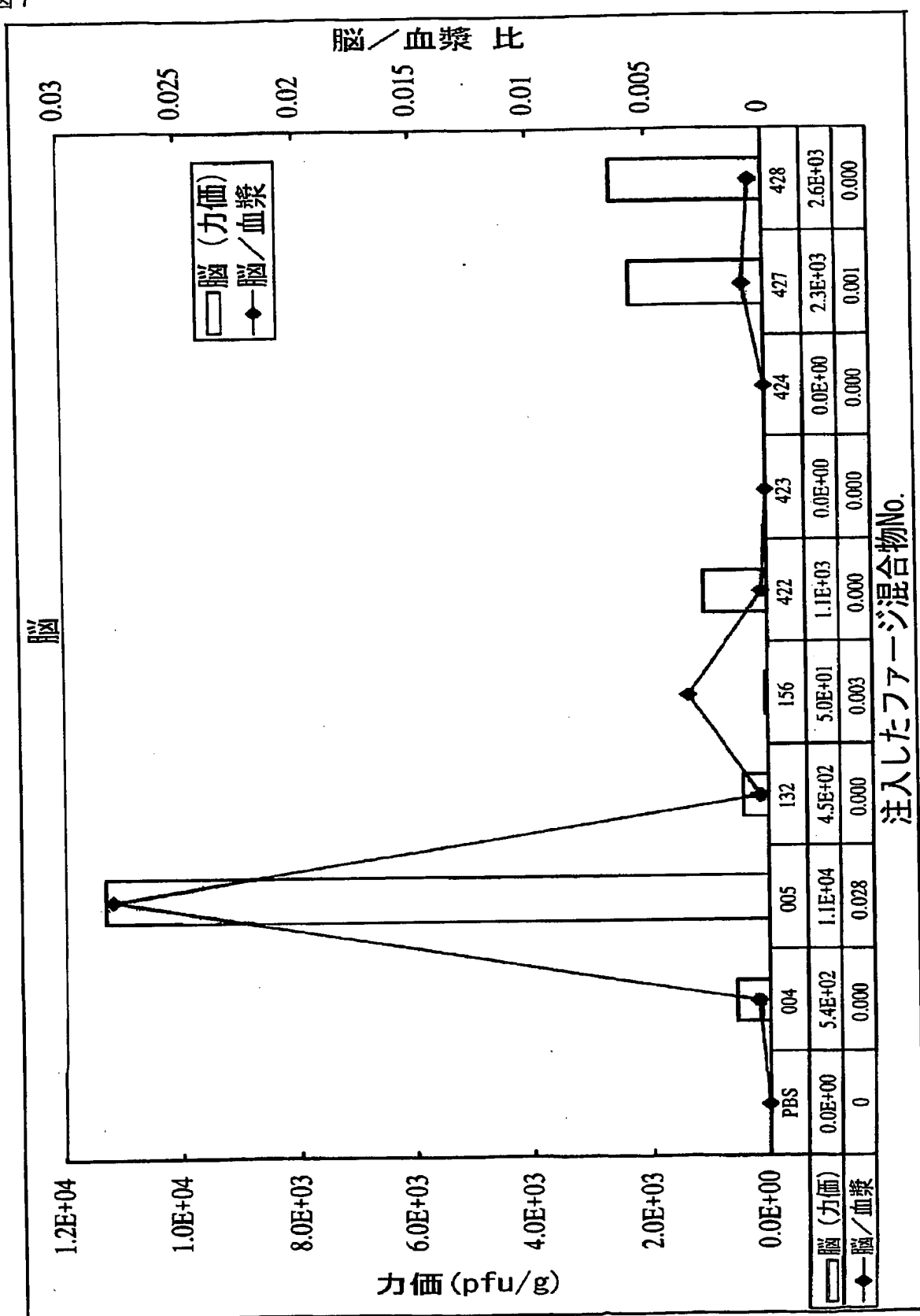


図 7



8 / 24

図 8

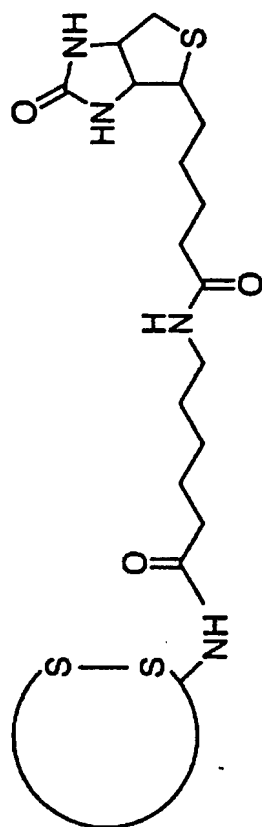
ビオチン

図 9

9 / 2 4

対照

ピオチン-T2J002

ピオチン-T2J004

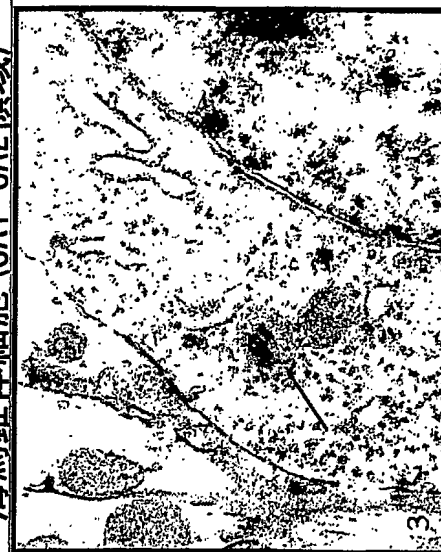
海馬錐体細胞 (CA1-CA2領域)

海馬錐体細胞 (CA1-CA2領域)

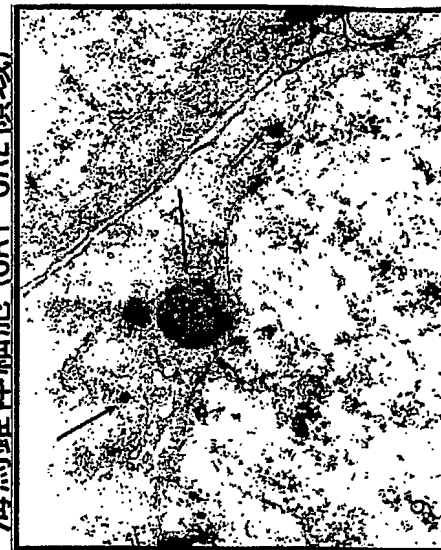
海馬錐体細胞 (CA1-CA2領域)



1



3

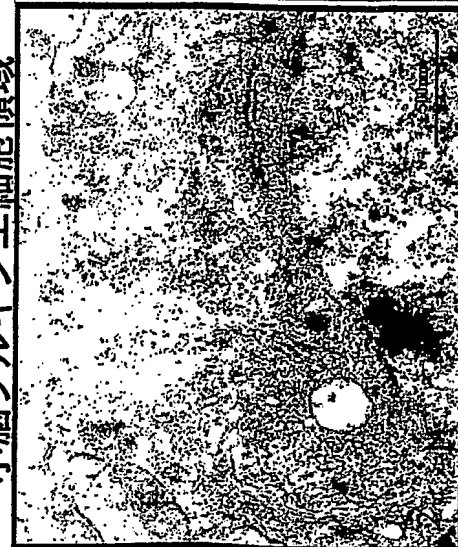


9

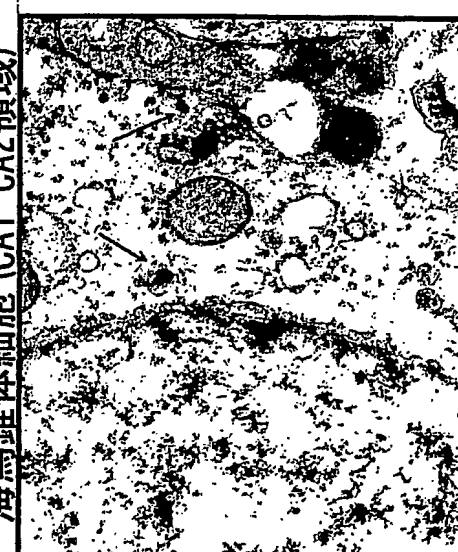
小脳プルキンエ細胞領域

海馬錐体細胞 (CA1-CA2領域)

海馬錐体細胞 (CA1-CA2領域)



2



5



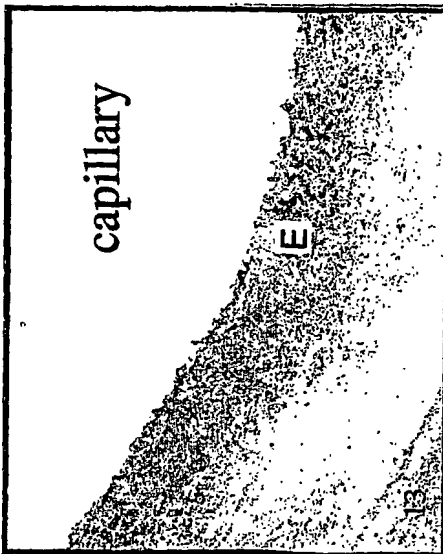
10

500nm

10/24

図10

対照
(アビジン-金コロイド)
バイオチン-T2J002
金コロイド
コンジュゲート
バイオチン-T2J002



13



6

500nm



14

100nm

11/24

図 11

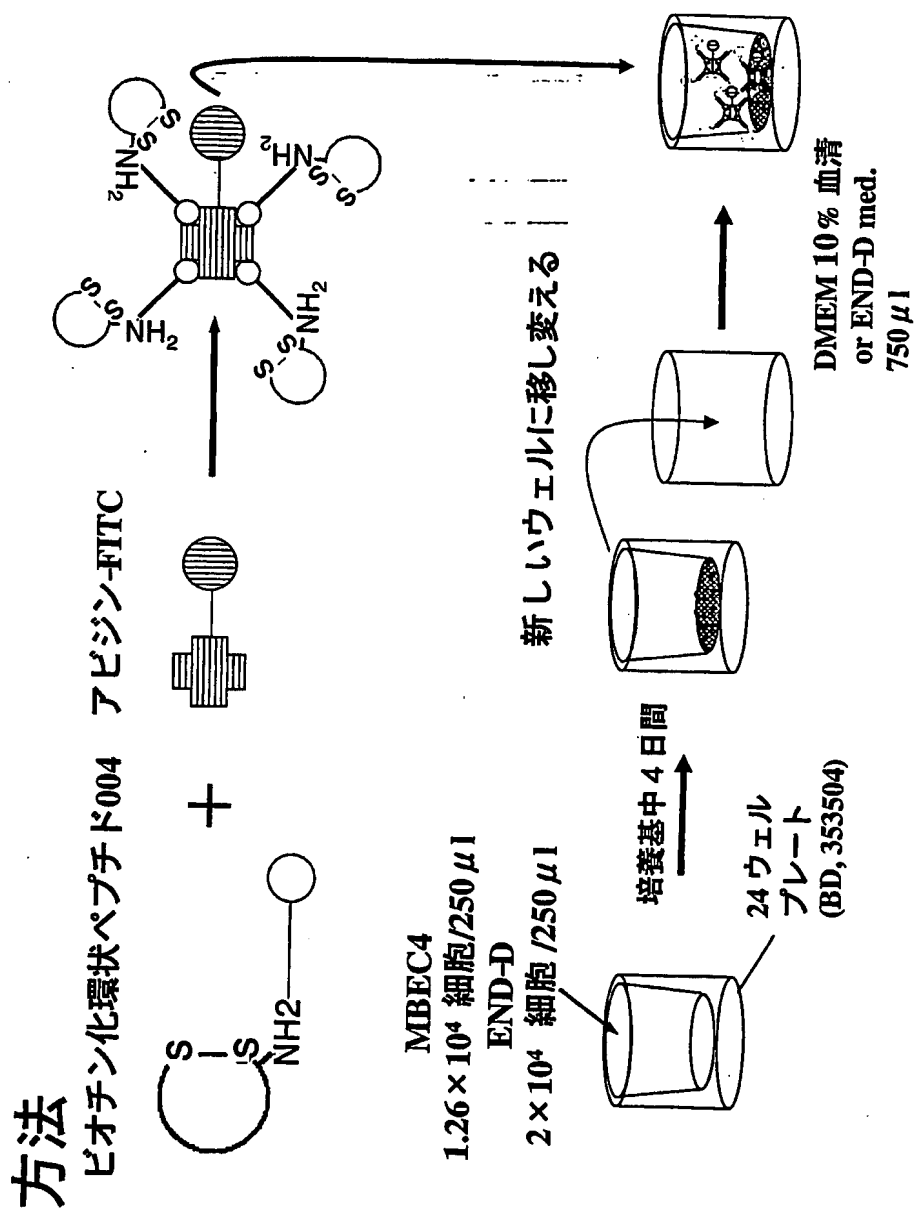
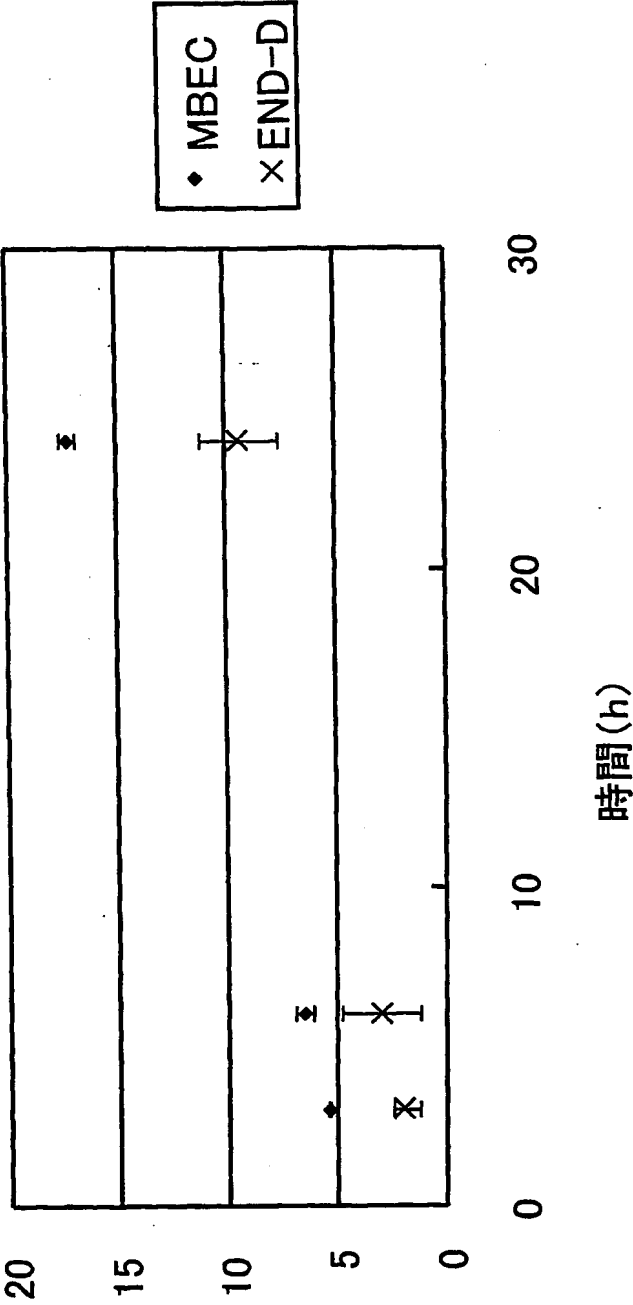
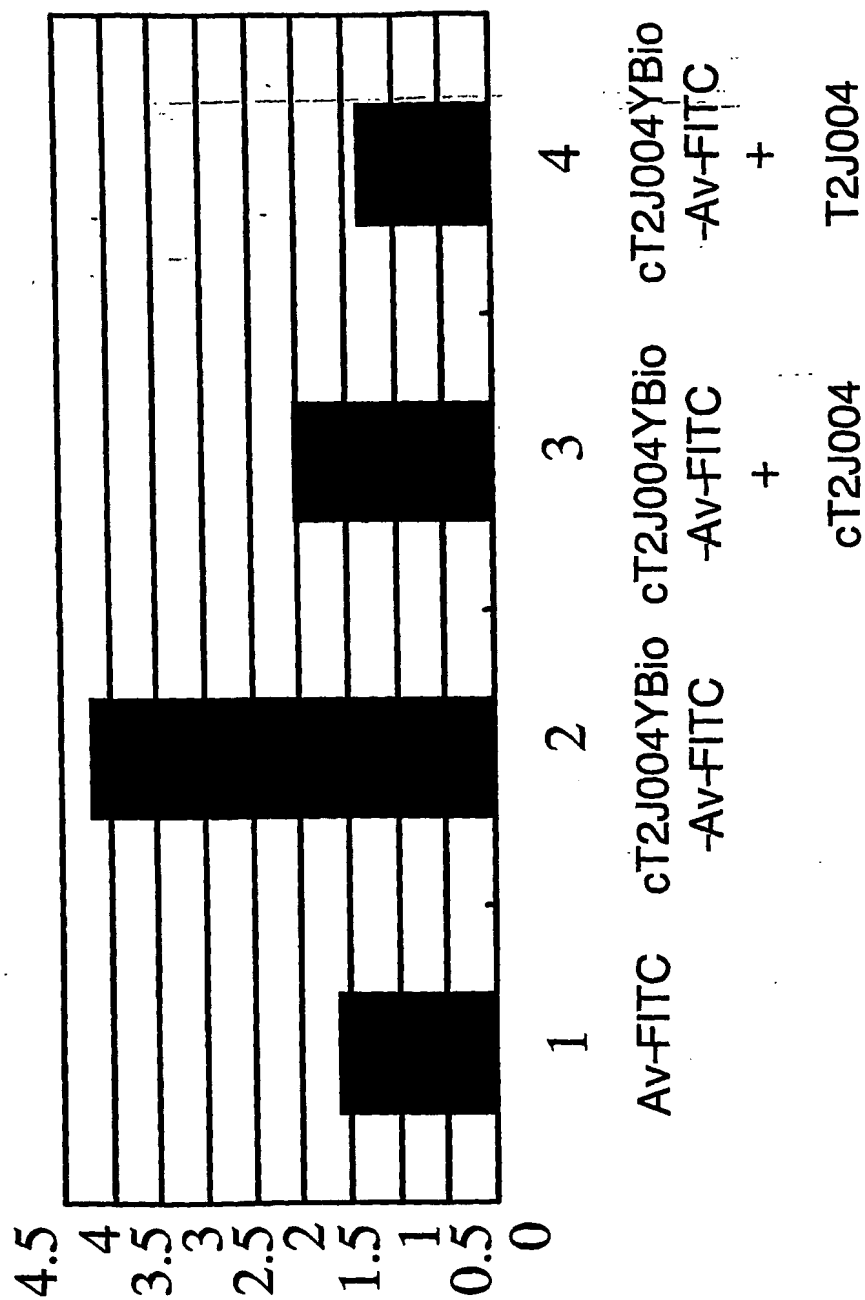


図 12



13 / 24

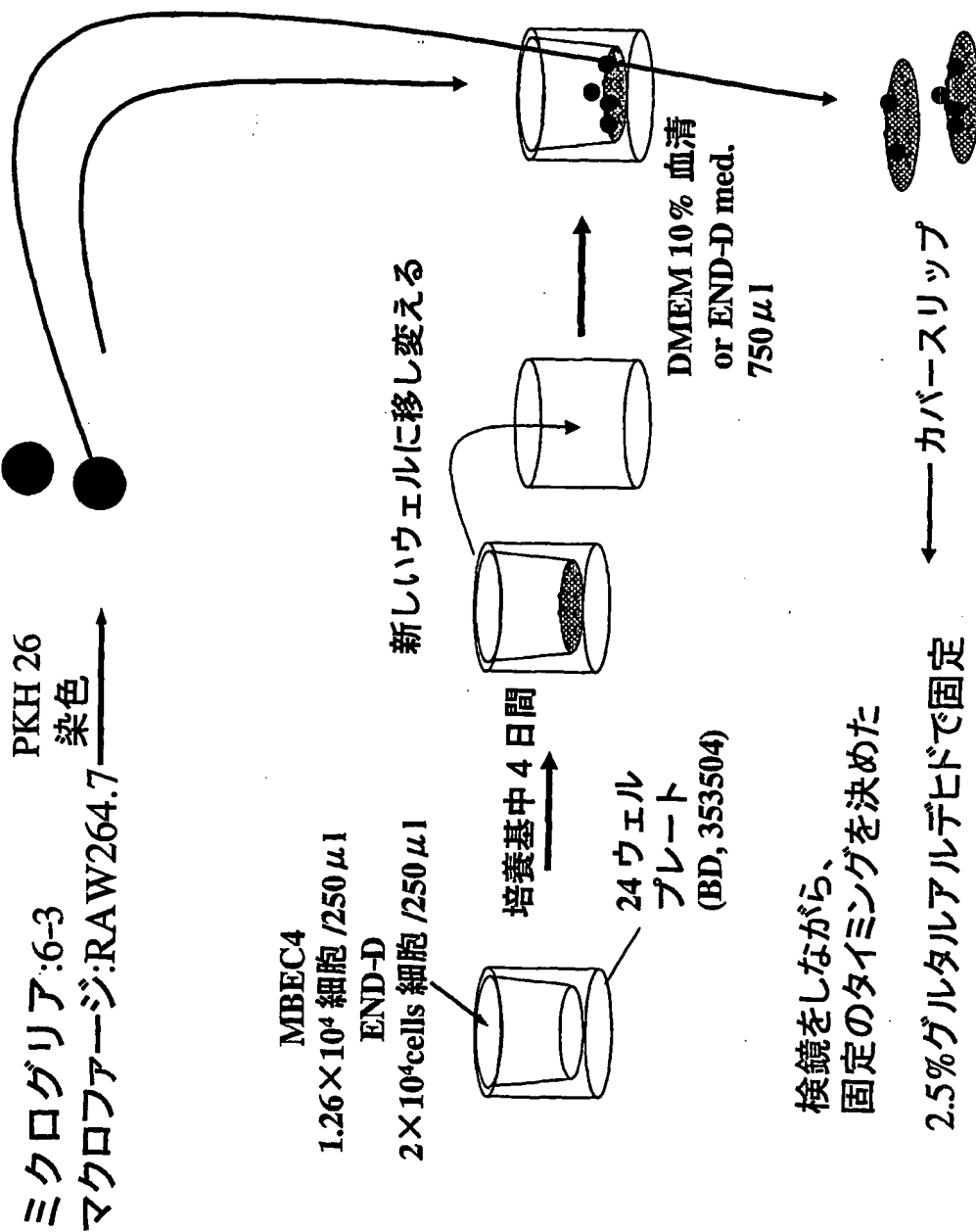
図 13



14 / 24

図 14

方法



15 / 24

図 15

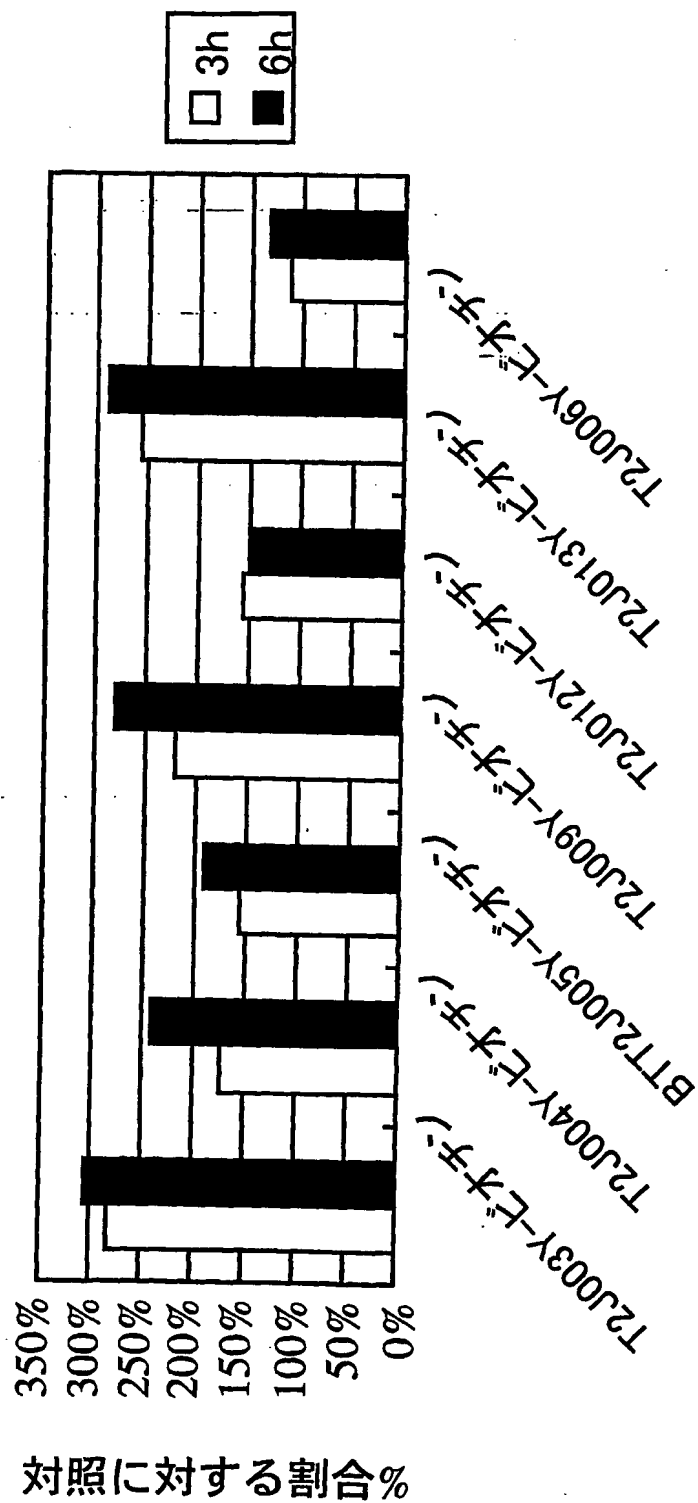
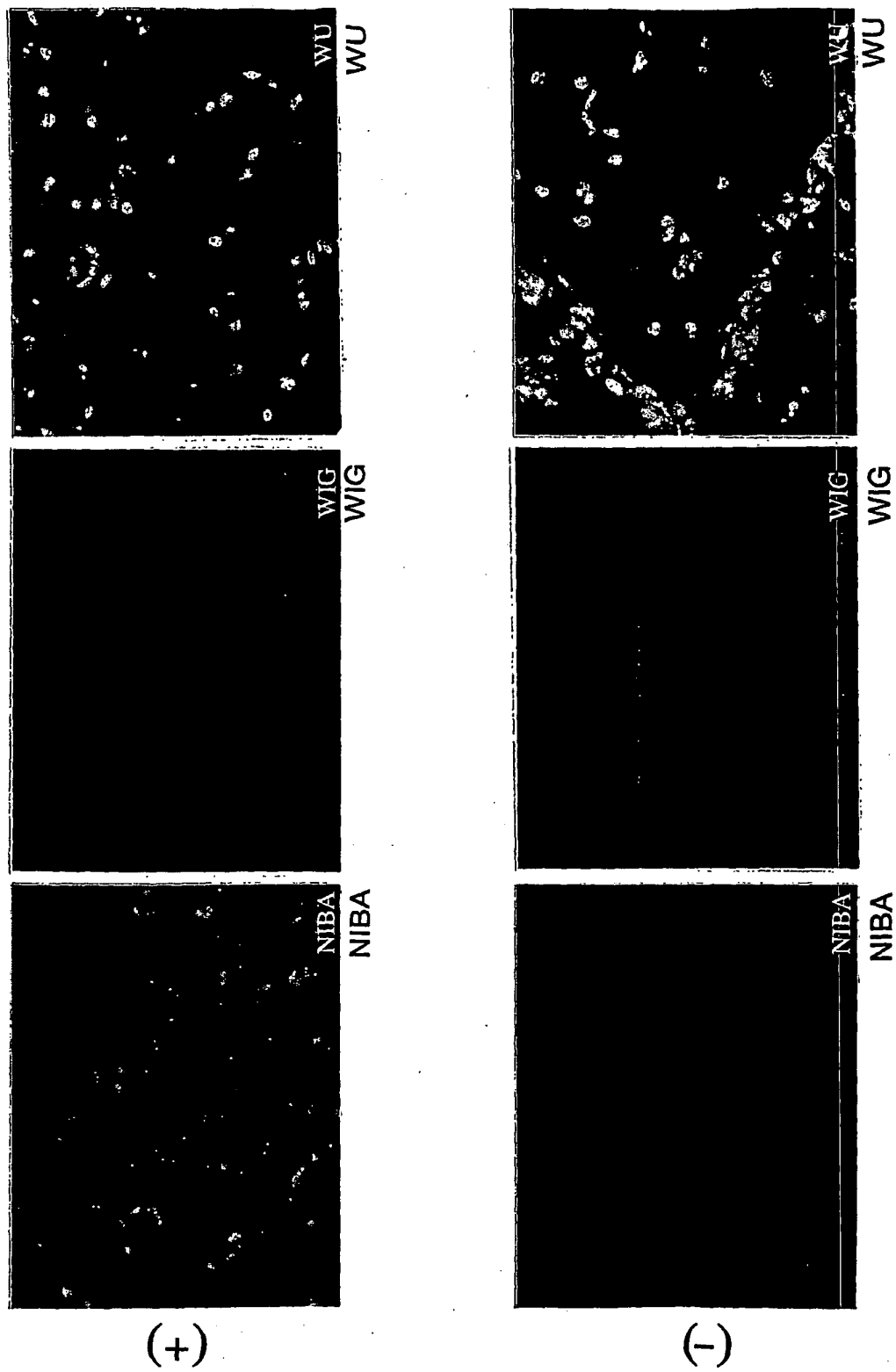


図 16

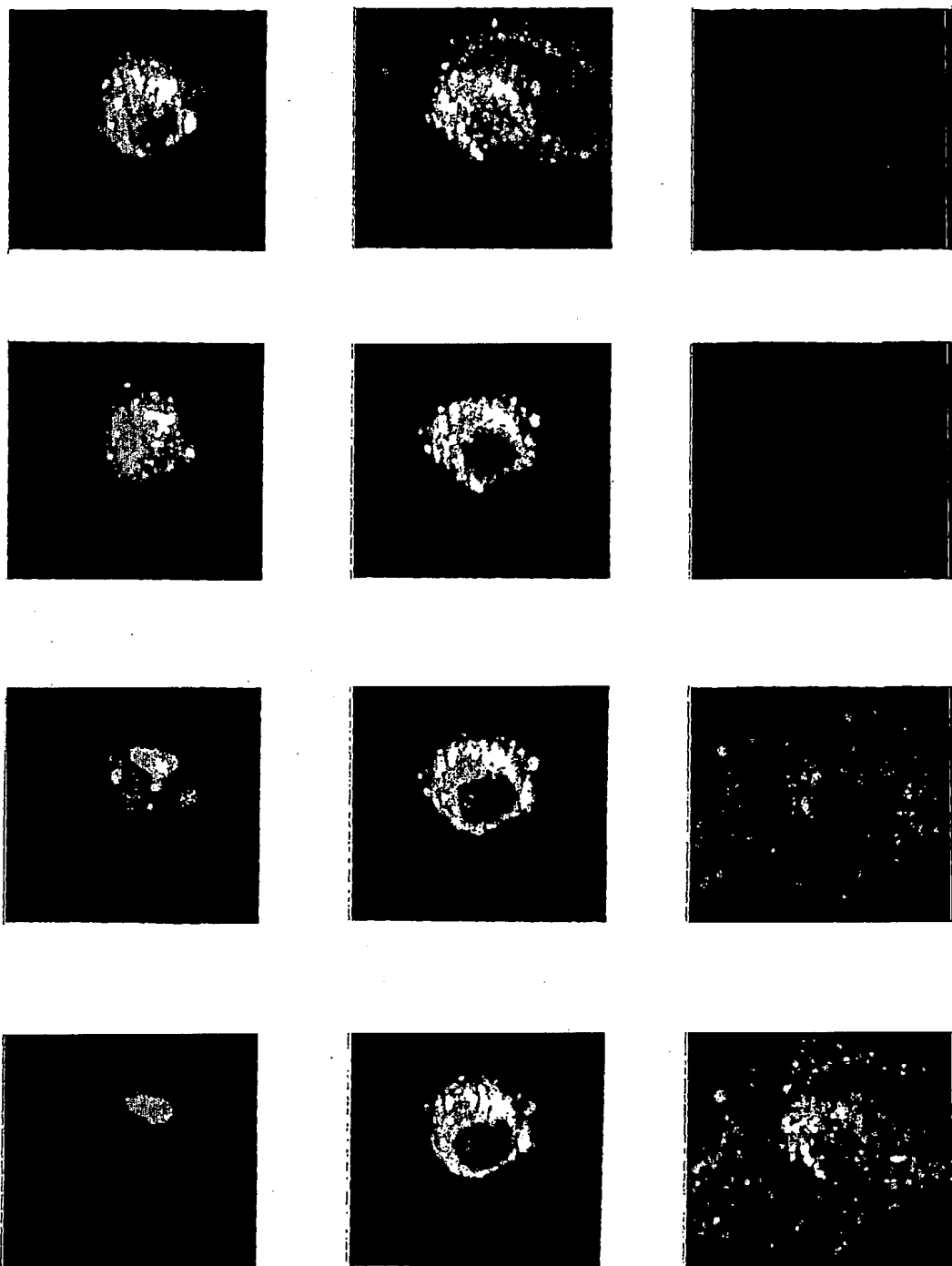
16/24



ファージ

17 / 24

図 17

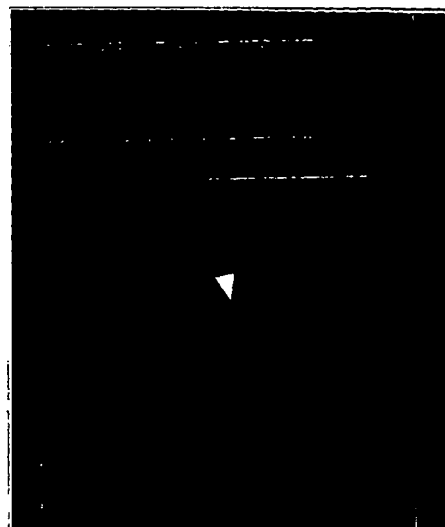
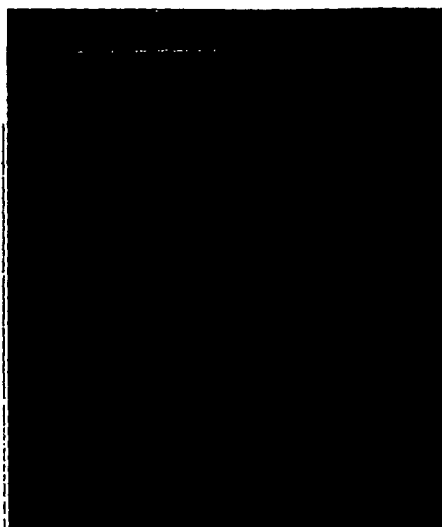


緑:ZO-1 / 赤:ミクログリア / 青:核

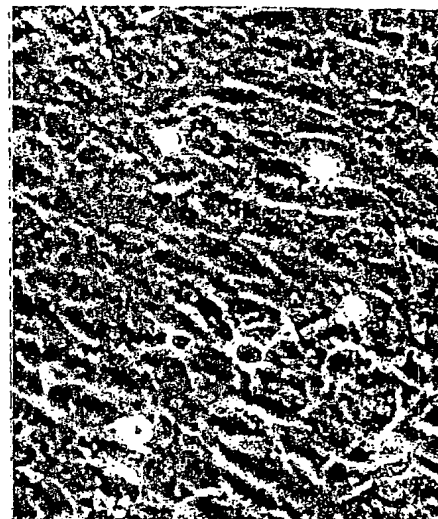
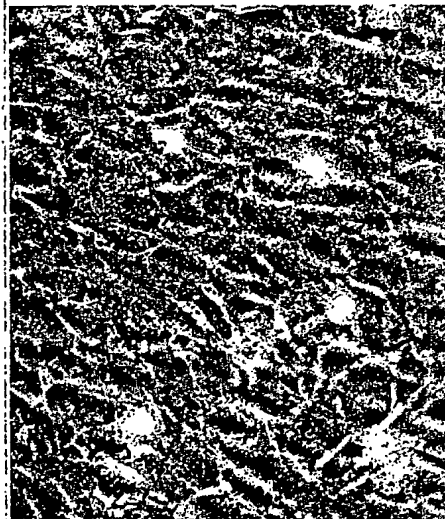
18 / 24

図 18

PKH26 染色 Mi



フェーズ

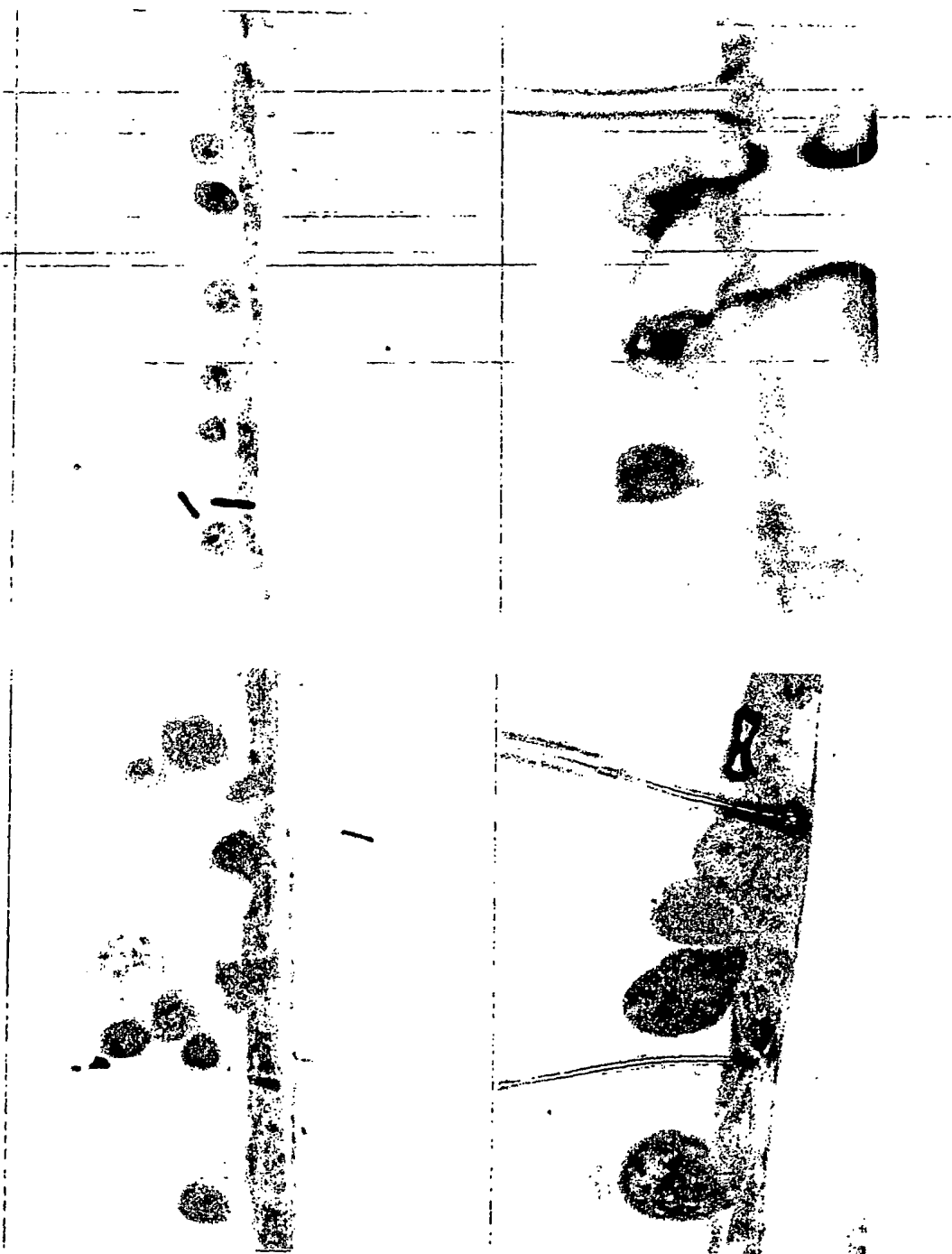


19 / 24

図 19

MBEC4+Raw264.7

MBEC4+6-3



20 / 24

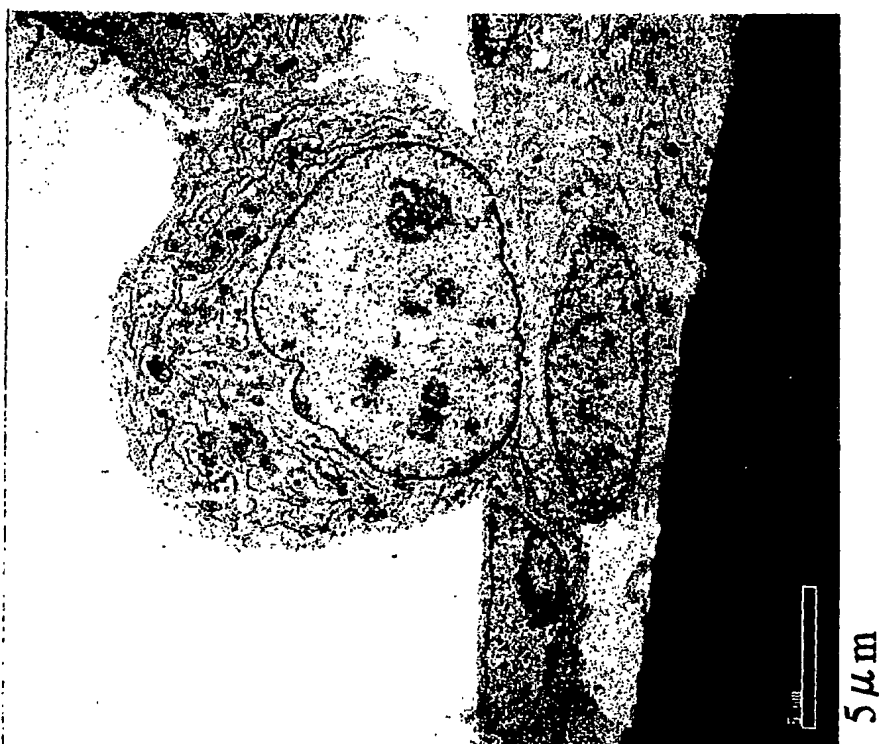
図 20



0.2 μ m

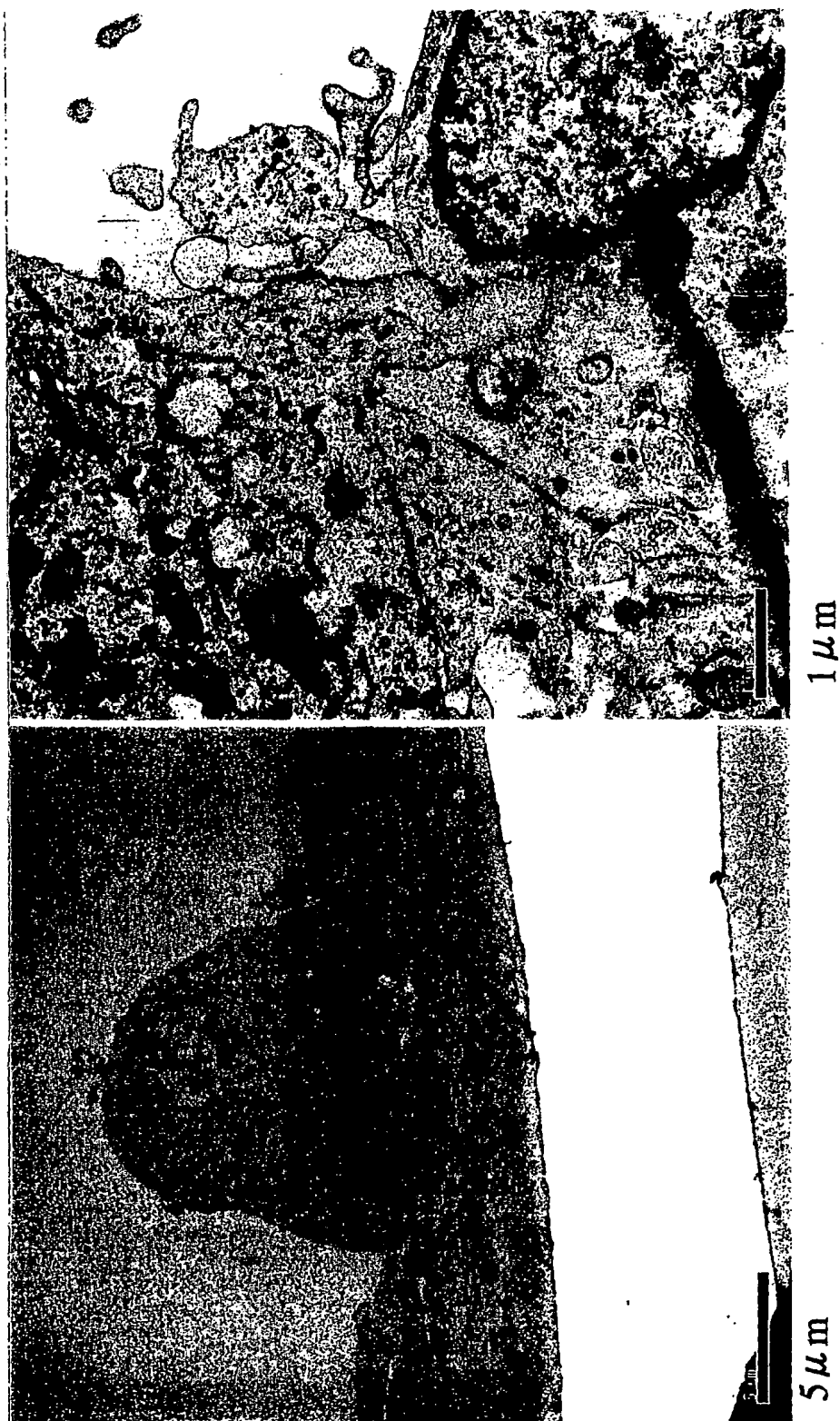
21 / 24

図 21



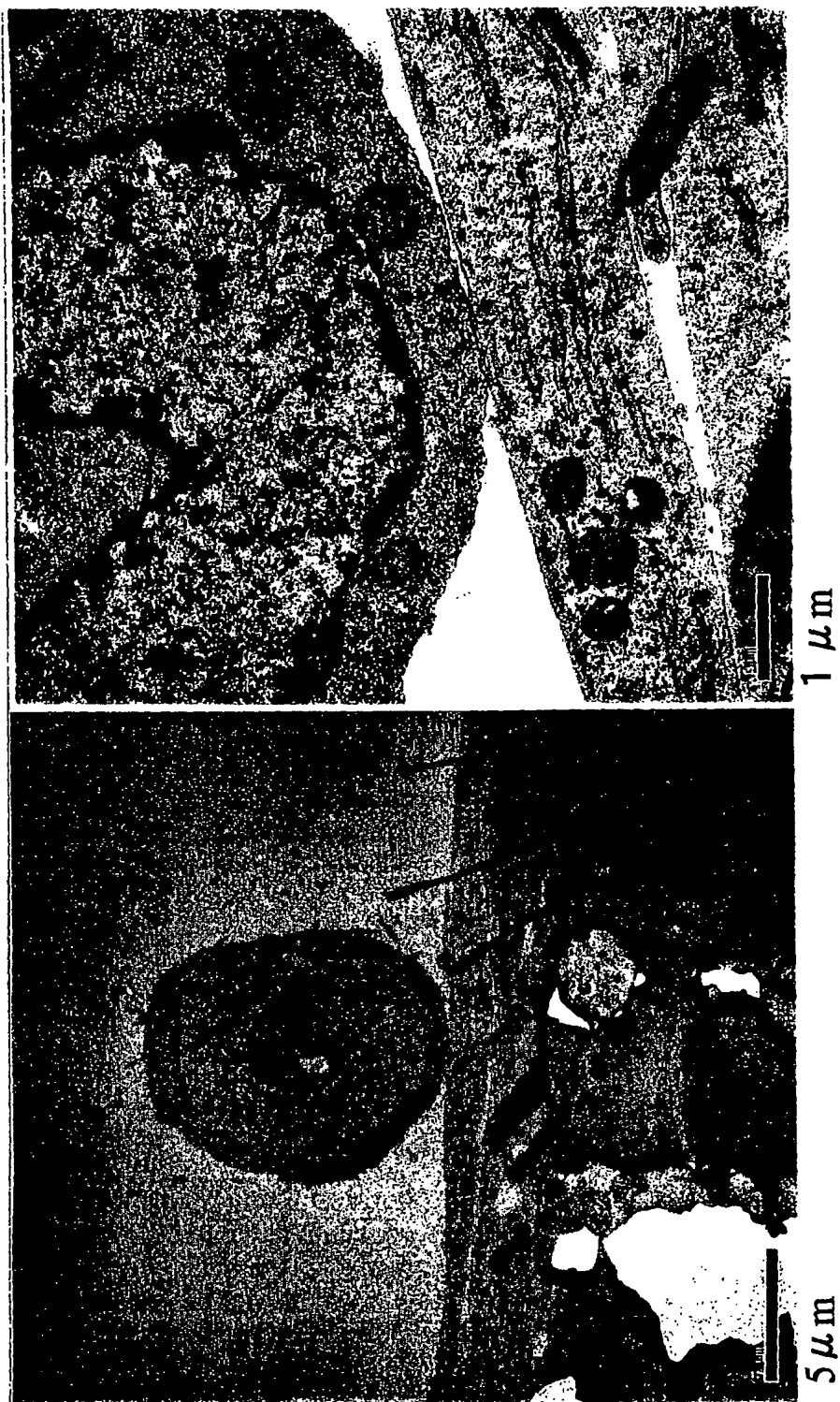
22/24

図 22



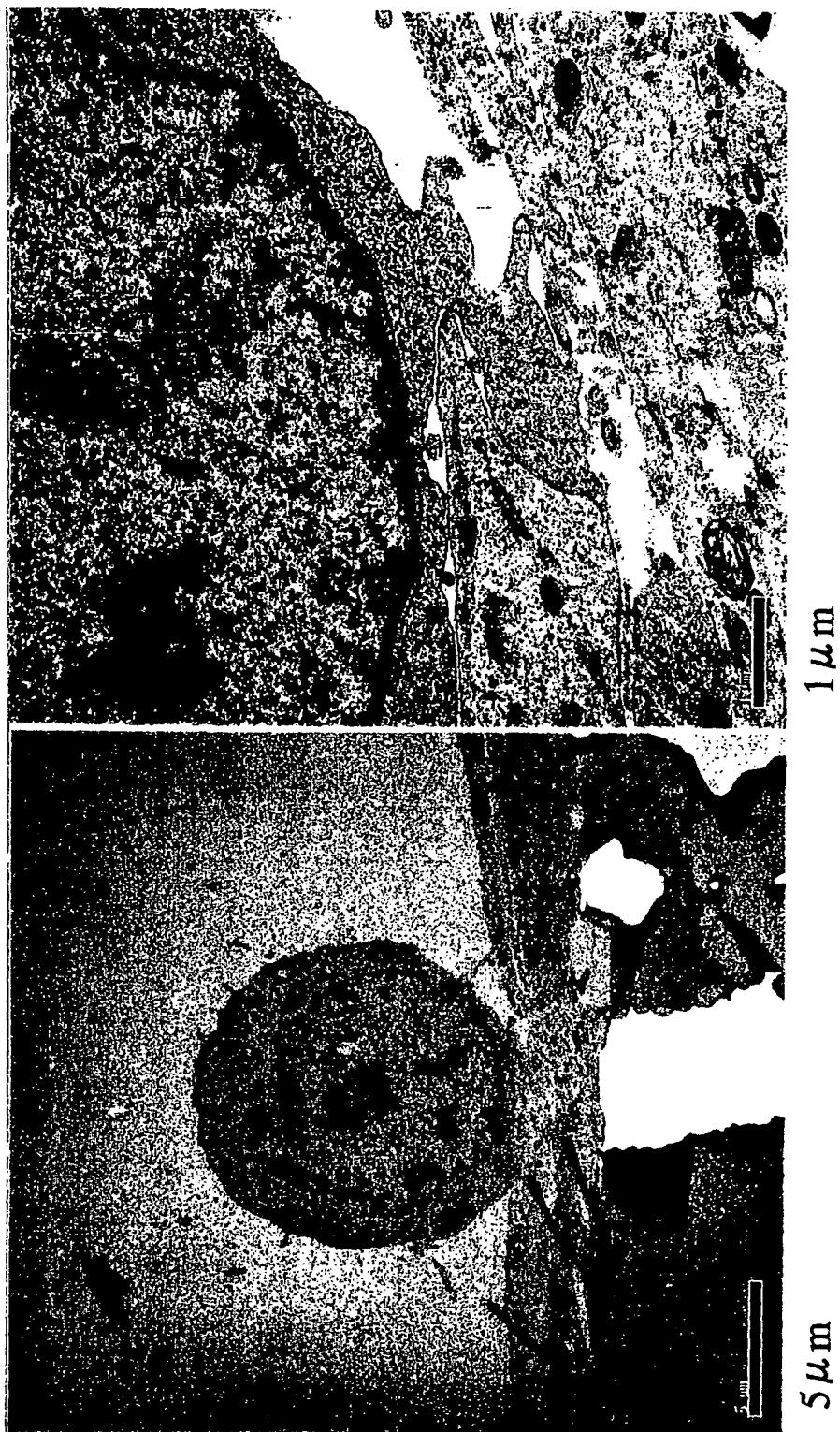
23 / 24

図 23



24 / 24

図 24



1 / 19

SEQUENCE LISTING

<110> TISSUE TARGETING JAPAN INC.

<120> Polypeptides having ability of transition into brain, and use thereof

<130> TTJ-A0301P

<150> JP 2003-289890

<151> 2003-08-08

<160> 24

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 1

Cys Ser Asn Leu Leu Ser Arg His Cys

1

5

2 / 19

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 2

Cys Ser Leu Asn Thr Arg Ser Gln Cys

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 3

Cys Val Ala Pro Ser Arg Ala Thr Cys

1 5

3 / 19

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 4

Cys Val Val Arg His Leu Gln Gln Cys

1

5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 5

Cys Val Leu Arg His Leu Gln Gln Cys

1

5

4 / 19

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 6

Cys Arg Gln Leu Val Gln Val His Cys

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 7

Cys Gly Pro Leu Lys Thr Ser Ala Cys

1 5

5 / 19

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 8

Cys Leu Lys Pro Gly Pro Lys His Cys

1

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 9

Cys Arg Ser Pro Gln Pro Ala Val Cys

1

5

6 / 19

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 10

Cys Asn Pro Leu Ser Pro Arg Ser Cys

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 11

Cys Pro Ala Gly Ala Val Lys Ser Cys

1 5

7 / 19

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 12

Cys Pro Ala Gly Ala Leu Lys Ser Cys

1 5

<210> 13

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 13

gatatgggata aacaac

8 / 19

<210> 14

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (19).. (20)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (22).. (23)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (25).. (26)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

9 / 19

<222> (28).. (29)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (31).. (32)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (34).. (35)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (37).. (38)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (40).. (41)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (43).. (44)

10/19

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (46).. (47)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (49).. (50)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (52).. (53)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (55).. (56)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (58).. (59)

<223> "n" = a, t, g, or c.

11 / 19

<220>

<221> misc_feature

<222> (61).. (62)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<400> 14

gaatccatgc agaatttcnn knknknknkn knknknknkn knknknknkn knknknknkn 60

nnkaagcctg ctacagacca t 81

<210> 15

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (21).. (22)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

1 2 / 1 9

<221> misc_feature

<222> (24).. (25)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (27).. (28)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (30).. (31)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (33).. (34)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (36).. (37)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

13 / 19

<222> (39).. (40)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (42).. (43)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (45).. (46)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (48).. (49)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (51).. (52)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (54).. (55)

1 4 / 1 9

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (57).. (58)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (60).. (61)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (63).. (64)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<400> 15

gatccatgca gaattcctgc nnknknknkn nknknknkn knknknknkn nnknknknkn 60

nnknktgcaa gcttgctaca gaccat 86

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

1 5 / 1 9

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

gaatccatgc agaattcc

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 17

atggtctgta gcaagctt

18

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

1 6 / 1 9

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 18

gatccatgca gaattcctgc

20

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 19

atggtctgta gcaagcttgc a

21

<210> 20

<211> 236

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 20

caccaagcgt tggattgttc acccactaat agggaacgtg agctgggttt agaccgtcgt

60

17 / 19

gagacaggtt agttttaccc tactgatgat gtgttgttgc catggtaatc ctgctcagta 120

cgagaggaac cgcaggttca gacatttggc gtagtgtgctt ggctgaggag ccaatggggc 180

gaagctacca tctgtgggat tatgactgaa cgcctctaag tcagaatccc gccag 236

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 21

gctctgcggt aggtactgtt 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

18 / 19

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 22

cgggtgccccca aagaatcggt

20

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 23

Met Leu Gly Asp Pro Asn Cys Val Lys Gln Ala Val Gln Ser Ser Val

1

5

10

15

Lys His Pro Asp Leu Ser Cys Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu

20

25

30

<210> 24

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

19 / 19

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 24

Met Leu Gly Asp Pro Asn Cys Pro Arg Gly Leu Pro Val Thr Thr Arg

1 5 10 15

Leu Met Glu Lys Ser Lys Cys Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu

20 25 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011668

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K7/06, 16/44, 19/00, C12N7/00, 15/11, C12P21/02, C12Q1/70, A61K38/08, 48/00, A61P25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K7/06, 16/44, 19/00, C12N7/00, 15/11, C12P21/02, C12Q1/70, A61K38/08, 48/00, A61P25/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JICST FILE (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Pasqualini R. et al., "Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries.", Nature, 1996, Vol.380, No.6572, p.364-6	1-15, 17, 18, 20-23, 25-30
Y		16, 19, 24
X	Schwarze S.R. et al., "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse.", Science, 1999, Vol.285, No.5433, p.1569-72	1, 5, 7-10, 13-17, 19, 20, 23-26
Y		21, 22
A	YOUNG-SOOK KANG et al., "Stability of the Disulfide Bond in an Avidin-Biotin Linked Chimeric Peptide During in vivo Transcytosis Through Brain Endothelial Cells.", Journal of Drug Targeting, 2000, Vol.8, No.6, pages 425 to 434	1-30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 November, 2004 (05.11.04)

Date of mailing of the international search report
22 November, 2004 (22.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011668

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Makoto SAWADA et al., "Brain-specific gene expression by immortalized microglial cell-mediated gene transfer in the mammalian brain.", FEBS Letters, 1998, Vol.433, pages 37 to 40	1-30
P, X	WO 2004/015392 A2 (TARGETED MOLECULES CORP.), 19 February, 2004 (19.02.04), & US 2004/110681 A1 & AU 2003-264030 A1	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011668

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-10, 12-26
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The inventions as set forth in claims 1 to 10 and 12 to 26 involve a great number of polypeptides having brain disposition activity. However, it appears that only small part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and (continued to extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to claims 1 to 30 resides in "a polypeptide having brain disposition activity". As a result of the search, it is found out that "a polypeptide having brain disposition activity" is not novel because of having been disclosed in document (Science, 03 September, 1999 (03.09.99); 285(5433): 1569-72). Accordingly, "a polypeptide having brain disposition activity" falls within the category of prior art and, therefore, this common matter cannot be regarded as a special technical feature. Such being the case, the inventions as set forth in claims 1 to 30 are classified into 13 groups of inventions, i.e., 12 groups of inventions having special technical features respectively in a polypeptide comprising (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
The parts relating to SEQ ID NO:1 in claims 1 to 30.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011668

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

the amino acid sequence disclosed therein in the meaning within PCT Article 5. Thus, the search was made exclusively on the part relating to a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 in the parts supported by the description.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

represented by SEQ ID NO:1, a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2, a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:3, a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:4, a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:5, a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:6, a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:7, a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:8, a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:9, a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:10, a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:11, a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:12, and a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:13, and a group of inventions comprising other parts.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁷ C07K7/06, 16/44, 19/00, C12N7/00, 15/11, C12P21/02, C12Q1/70, A61K38/08, 48/00, A61P25/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁷ C07K7/06, 16/44, 19/00, C12N7/00, 15/11, C12P21/02, C12Q1/70, A61K38/08, 48/00, A61P25/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE (STN) · BIOSIS (STN) WPIDS (STN) JICSTファイル (JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq CA (STN) REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Pasqualini R, et. al., "Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries."	1-15, 17, 18, 20-23, 25-30
Y	Nature., 1996, Vol. 380, No. 6572, p. 364-6	16, 19, 24
X	Schwarze SR, et. al., "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse."	1, 5, 7-10, 13-1
Y	Science, 1999, Vol. 285, No. 5433, p. 1569-72	7, 19, 20, 23-26 21, 22
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 05. 11. 2004		国際調査報告の発送日 22.11.2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 晴絵 4N 9739 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	YOUNG-SOOK KANG, et. al., "Stability of the Disulfide Bond in an Avidin-Biotin Linked Chimeric Peptide During in vivo Transcytosis Through Brain Endothelial Cells." Journal of Drug Targeting, 2000, Vol. 8, No. 6, p. 425-434	1-30
A	Makoto SAWADA, et. al., "Brain-specific gene expression by immortalized microglial cell-mediated gene transtfer in the mammalian brain." FEBS Letters, 1998, Vol. 433, p. 37-40	1-30
P X	WO 2004/015392 A2 (TARGETED MOLECULES CORP.) 2004.02.19 & US 2004/110681 A1 & AU 2003-264030 A1	1-30

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1-10, 12-26 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲1-10, 12-26には、非常に多数の脳移行活性を有するポリペプチドを包含する発明が記載されている。しかしながら、PCT6条の意味において、明細書に裏付けられ、また、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされた発明のごくわずかな部分にすぎない。よって、調査は、明細書に裏付けられている部分のうち、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドに関する部分について行った。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-30に共通の事項は「脳移行活性を有するポリペプチド」であるが、調査の結果、「脳移行活性を有するポリペプチド」は文献（Science, 1999 Sep 3;285(5433):1569-72.）に開示されているから、新規でないことが明らかとなった。結果として、「脳移行活性を有するポリペプチド」は先行技術の域をでないから、この共通事項は特別な技術的特徴とすることはできない。それ故、請求の範囲1-30に記載の発明は、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号5に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号7に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号9に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号11に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドに特別な技術的特徴を有する12群の発明と、それ以外の部分からなる1群の発明との、13群の発明に分類される。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-30のうち、配列番号1に関する部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。